

N° D'ORDRE : 156

ANNÉE : 1972

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ

DE LYON

POUR OBTENIR

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ

(3° CYCLE)

DE SCIENCES BIOLOGIQUES

(PHYSIOLOGIE ANIMALE)

PAR

CHRISTIAN DEMIGNÉ

~ ~ ~

LE RÔLE DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE EXOCRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTÉROL CHEZ LE LAPIN

~ ~ ~

SOUTENUE LE 29 JUIN 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. M. G. PÈRES _____ PRÉSIDENT

J. BÉZARD _____
G. BACQUÈS _____ } EXAMINATEURS

N° D'ORDRE : 156

ANNÉE : 1972

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ

DE LYON

POUR OBTENIR

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ

(3° CYCLE)

DE SCIENCES BIOLOGIQUES

(PHYSIOLOGIE ANIMALE)

PAR

CHRISTIAN DEMIGNÉ

~ ~ ~

LE RÔLE DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE EXOCRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTÉROL CHEZ LE LAPIN

~ ~ ~

SOUTENUE LE 29 JUIN 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M M. G. PÈRES _____ PRÉSIDENT

J. BÉZARD _____)
C. BACOUÈS _____) EXAMINATEURS



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN.

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche

M. le Professeur D. GERMAIN

U.E.R. médicale Alexis-Carrel

M. le Professeur C. GIROD

U.E.R. médicale LYON-Nord

M. le Professeur A. BERTOYE

U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest

M. le Professeur L. TOLOT

U.E.R. des Sciences pharmaceutiques

M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé

U.E.R. des Techniques de Réadaptation

M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN

U.E.R. de Biologie humaine

M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé

U.E.R. d'Education Physique et Sportive

M. A. MILLON, Professeur E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques

M. R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques

M. le Doyen J. BRACONNIER

U.E.R. de Physique

M. le Professeur M. DUFAY

U.E.R. de Chimie et Biochimie

M. le Professeur D. GAUTHERON

U.E.R. des Sciences de la Nature

M. le Professeur L. DAVID

U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie

M. le Professeur R. FONTANGES

U.E.R. de Physique nucléaire

M. le Professeur A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique

M. le Professeur J. MATHIEU

Observatoire

M. le Professeur J. H. BIGAY

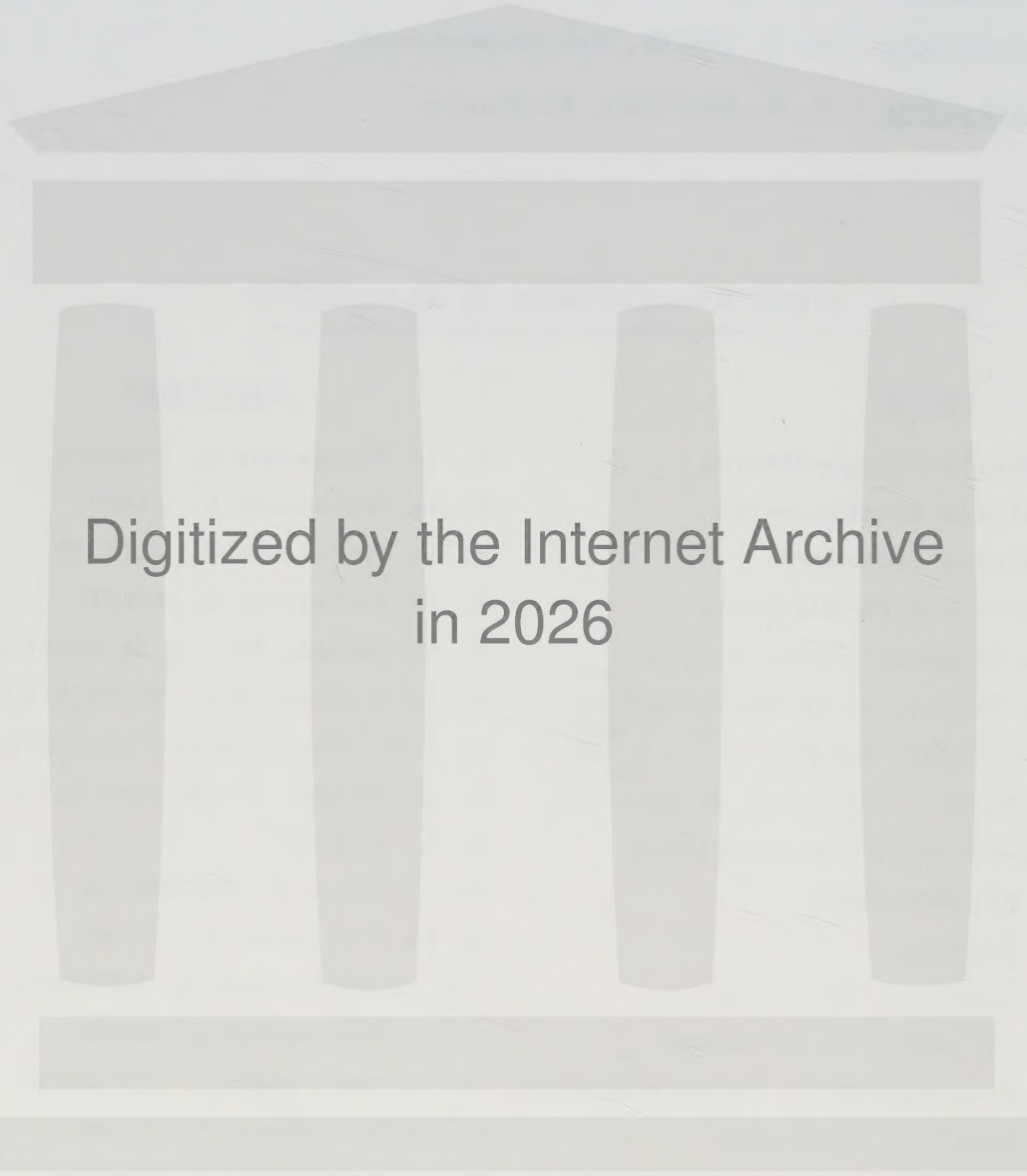
Institut Universitaire de Technologie 1

M. le Professeur B. POUYET

Institut Universitaire de Technologie 2

M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0003

T H E S E

présentée

devant l'Université Claude Bernard LYON

pour obtenir

le Diplôme de Docteur de Spécialité (3^e cycle)

de Sciences Biologiques (Physiologie)

par

Christian DEMIGNE

LE RÔLE DE LA SECRETION PANCREATIQUE EXOGENE
DANS L'ABSORPTION INTESTINALE
DU CHOLESTEROL CHEZ LE LAPIN.

Ce travail a été réalisé à l'Institut Universitaire de Technologie de LYON I, dans le Département de Biologie appliquée dont le Directeur, Monsieur le Professeur LEGAY a mis à notre disposition d'importants moyens matériels.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Docteur BACQUES qui a guidé mes premiers pas dans le domaine de la recherche avec beaucoup de compétence et de bienveillance.

J'exprime mes très sincères remerciements à Monsieur le Professeur PERES qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury ainsi qu'à Monsieur le Docteur BEZARD pour l'intérêt qu'il porte à ce travail en acceptant d'en être juge et dont l'équipe m'a initié à la radiochimie.

SOMMAIRE

Introduction, situation du problème

- modalités d'absorption du cholestérol chez les mammifères autres que le lapin
- rôle de la sécrétion pancréatique
- cas particulier du lapin.

Chapitre I - Techniques expérimentales générales.

I - Techniques physiologiques.

1. Maintenance des animaux
2. Prélèvements
3. Ligature du canal de Wirsung
4. Recueil du suc pancréatique

II - Techniques biochimiques.

1. Extraction et séparation des lipides
 - a) Extraction des lipides
 - b) Séparation des différentes classes lipidiques
2. Dosage des lipides
 - a) Dosage du cholestérol libre et estérifié
 - b) Dosage des autres lipides par chromatographie en phase gazeuse

Interprétation
3. Techniques de marquage isotopique
 - a) Principe du comptage par scintillation liquide
 - b) Comptage d'un seul émetteur par la méthode du rapport de canaux
 - c) Double comptage avec standardisation externe
 - d) Synthèse enzymatique de l'oléate de cholestéryle tritié

Chapitre II - L'influence de la ligature du canal de Wirsung sur l'apport du cholestérol à l'organisme.

I - Protocole expérimental.

II - Résultats.

1. Lipémies
2. Cholestérolémies
3. Composition des lipides plasmatiques
4. Composition en acides gras des lipides plasmatiques

III - Discussions.

Chapitre III - Etude "in vivo" de l'influence de la sécrétion pancréatique sur le sort du cholestérol et de ses esters dans l'intestin.

I - Dans la lumière intestinale.

1. Protocole expérimental
 - a) Principe
 - b) Préparation de l'émulsion
 - c) Administration et prélèvements
 - d) Dosages
2. Résultats
 - a) Sort du cholestérol libre
 - b) Sort du cholestérol estérifié
3. Discussions et conclusions

II - Dans la muqueuse intestinale.

1. Protocole expérimental
 - a) Principe
 - b) Préparation de l'émulsion
 - c) Administration et prélèvements
 - d) Dosages
2. Résultats
 - Captation du cholestérol libre
 - Captation du cholestérol estérifié
3. Discussions et conclusions

Chapitre IV - Etude "in vitro" de l'influence de la sécrétion pancréatique sur les activités cholestérol estérasiques dans le contenu intestinal.

I - Etude "in vitro" de l'activité cholestérol estérasique du suc pancréatique.

1. Généralités

2. Protocole expérimental

- a) Milieux d'incubation pour l'étude de l'activité estérifiante
- b) Milieux d'incubation pour l'étude de l'activité hydrolytique
- c) Conditions d'incubation

3. Résultats

- a) Estérifications
- b) Hydrolyses

4. Discussions et conclusions

II - Etude "in vitro" de l'influence de la sécrétion pancréatique sur les activités cholestéroléstatiques de contenus digestifs.

1. Généralités

2. Protocole expérimental

- a) Milieu d'incorporation
Préparation d'homogénats de contenus digestifs
- b) Incubations

3. Résultats

- a) Estérifications
- b) Hydrolyses

4. Discussions et conclusions

Discussion générale

Conclusions

Bibliographie.

AVANT PROPOS

La présente étude se propose de préciser le sort du cholestérol et de ses esters dans l'intestin du lapin en s'attachant plus particulièrement au rôle imparti à la sécrétion pancréatique exocrine dans les échanges réalisés entre les deux formes de cholestérol - libre et estérifié - et leurs absorptions respectives.

Nous ne considérons pas toutes les phases du cycle du cholestérol sur lesquelles est susceptible d'intervenir la sécrétion pancréatique. Nous nous limiterons à l'étude de l'influence de cette sécrétion sur l'étape intestinale. D'autre part nous ne suivons que le sort du cholestérol-naturel ou apporté artificiellement à l'exception des autres stérols intestinaux, leur étude nécessitant la mise en oeuvre de techniques que nous n'avons pas pratiquées.

Dans une première partie, nous envisagerons la mise au point de techniques physiologiques et biochimiques ; ces dernières devant permettre de doser, entre autres lipides, le cholestérol. Nous exposerons aussi les techniques isotopiques utilisées pour suivre le sort de cette molécule à doses traceuses.

Nous déterminerons in vivo dans la seconde partie l'importance de cette sécrétion vis-à-vis de l'apport de cholestérol dans l'organisme in toto et ce, avec un régime normal ou un régime enrichi en cholestérol.

La troisième partie sera consacrée à l'étude in vivo du rôle joué par la sécrétion pancréatique dans les échanges entre les fractions cholestérolées libres ou estérifiées dans le contenu intestinal d'une part, et à son influence sur la localisation et l'intensité de l'absorption dans le grêle d'autre part.

Dans la quatrième partie nous étudierons, par des épreuves in vitro, les variations de l'activité estérifiante du contenu intestinal, selon la portion de tube digestif envisagée et la présence de suc pancréatique.

INTRODUCTION

Le cholestérol n'est pas un métabolite indispensable pour les mammifères (BILLS 11). Le cholestérol libre, lorsqu'il est absorbé en quantités limitées, ne fait que remplacer le cholestérol qui aurait autrement été synthétisé par l'organisme.

Il en va tout autrement lorsque ce composé vient à être absorbé en quantités importantes : de nombreux travaux ont établi l'incidence de l'hypercholestérolémie consécutive à une absorption accrue de cholestérol sur la fréquence et la gravité des lésions athéromateuses (NICOD 62 et FAVARGER 28). A cet égard, parmi les mammifères, c'est le lapin qui a fait l'objet de l'utilisation la plus intense en raison de son aptitude à développer - en présence de régimes hypercholestérolés - une hypercholestérolémie et un athérome très semblables à ceux de l'homme.

Cette aptitude remarquable semble dûe surtout à la facilité avec laquelle le lapin absorbe le cholestérol, même présent à des taux très élevés dans la ration (DALLACHIO & Coll 22). Chez les autres mammifères il faut créer des conditions très particulières (par exemple, blocage de la fonction thyroïdienne chez le chien) pour obtenir des résultats semblables.

Le suc pancréatique joue un rôle capital dans l'absorption de tous les lipides. Il agit d'une part grâce à sa lipase et à ses phospholipases (A et B) qui lui permettent d'hydrolyser glycérides et phospholipides d'autre part grâce à sa cholestérol estérase qui catalyse réversiblement l'estérification du cholestérol avec les acides gras en présence d'acides biliaires (RIBET & PASCAL 66).

Les modalités d'absorption du cholestérol chez les mammifères autres que le lapin.

Parmi les plus anciens, les travaux de BYERS & Coll chez le rat (19) ont indiqué que le cholestérol devait être absorbé par la région distale du grêle. Ces auteurs s'appuyaient sur le fait qu'après l'occlusion de la moitié supérieure du grêle l'introduction de 100 mg de cholestérol directement dans la moitié distale n'était suivie d'aucune diminution du taux de cholestérol dans la lymphe.

Ces expériences ont été reprises et il a été établi qu'en fait le cholestérol récupéré dans la lymphe diminuait de 40 p cent, mais que la dérivation de la bile dans la moitié distale permettait une absorption normale. Ce protocole ne peut tout au plus indiquer que le grêle distal est capable d'absorber le cholestérol sous certaines conditions favorables.

SWELL & Coll (75) en 1958 ont montré une absorption plus importante de 4-¹⁴C cholestérol au niveau proximal. Plus récemment chez le hamster, FELDMAN & HENDERSON (30) par perfusion d'anses jéjunales et iléales ont constaté : d'une part une disparition plus rapide du cholestérol du milieu avec le jéjunum (50 p cent contre 20 p 100 dans l'iléon), d'autre part une captation plus forte dans la muqueuse jéjunale (42,4 p cent contre 24,6 p cent). Chez l'homme, BORGSTRÖM (13), par tubage à différents niveaux du grêle, a conclu que le cholestérol était principalement absorbé dans la partie proximale du duodénum. Cette dernière expérimentation, réalisée dans des conditions plus physiologiques, suggère fortement que, dans les conditions normales, l'absorption du cholestérol a lieu dans la première moitié du grêle, c'est-à-dire à peu près au même niveau que les autres lipides.

Il semble bien que le cholestérol estérifié ne soit absorbable que sous forme libre, les esters de cholestéryle devant être hydrolysés avant que l'absorption ne survienne.

VAHOUNY & TREADWELL (76) ont administré du cholestérol estérifié avec des acides gras ramifiés en α qui sont particulièrement résistants à l'hydrolyse enzymatique. Ils ont ainsi montré que le cholestérol n'est pas absorbé quand il est administré sous forme de triméthylacétate ; plus de 98 p 100 du cholestérol - 4 - ¹⁴C donné sous forme d' α , α , méthyl-éthyl caproate est récupéré intact dans les fèces et le contenu intestinal.

On pourrait objecter que ces résultats avaient été obtenus avec des esters d'acides gras très particuliers ; aussi GOODMAN & SHIRATORI (38) ont administré un ester tritié en 7 sur le noyau stérol et marqué au ¹⁴C sur l'acide gras. 65 à 75 p 100 du cholestérol tritié absorbé a été retrouvé dans les esters de la lymphe mais moins de 1,5 p 100 de l'acide marqué se retrouvait dans cette fraction, le cholestérol - 7 α - ³H restant se trouvant à l'état libre.

Le cholestérol retrouvé dans les chylifères (principale voie empruntée par le cholestérol lors de son absorption) est estérifié dans les proportions atteignant selon les auteurs 75 p 100 au bout de 24 heures (BORGSTRÖM 15) ou 90 p 100 au bout de 4 heures et 72 p 100 au bout de 9 heures selon TREADWELL & Coll (76).

La signification de cette estérification dans l'absorption du cholestérol reste controversée.

GLOVER (36) a montré que l'estérification accélérât l'absorption et que les acides biliaires étaient impliqués dans ce processus.

GALLO-TORRES & Coll (35) ont cependant mis en évidence une différence dans la hiérarchie des exigences en sels biliaires ; le taurocholate est le plus efficace en ce qui concerne l'apparition du cholestérol total dans la lymphe alors que le glycocholate est le plus efficace pour l'estérification. D'autre part, il s'est avéré que l'épicholestérol, bien que très mal estérifié par la cholestérol estérase in vitro, est absorbé par voie lymphatique à une vitesse qui n'est que deux fois plus lente que celle du cholestérol (HERNANDEZ & Coll 40). Ces dernières expériences tendent donc à attribuer un rôle relativement second à l'étape de l'estérification.

Le rôle de la sécrétion pancréatique dans l'absorption du cholestérol.

Le suc pancréatique favorise la formation de micelles dans la lumière intestinale : avec les acides biliaires, les produits de la digestion des triglycérides et des phospholipides (acides gras, monoglycérides, lysolécithines...) contribuent à la formation de ces édifices multimoléculaires complexes.

Les premières expériences en 1955 de CHAIKOFF & KAPLAN (20) ont montré un taux très bas de cholestérol libre et estérifié dans le sang de chiens dépancréatés ; l'addition de pancréas cru au régime produisant une nette augmentation du taux de cholestérol en particulier dans la fraction estérifiée.

C'est en 1943 que la cholestérol estérase du suc pancréatique fut mise en cause dans l'absorption du cholestérol par FONTAINE & Coll (32). Quelques années plus tard SWELL & Coll (73) mettaient en évidence une activité cholestérol estérasique dans la muqueuse et soulignaient que cette activité présentait des caractéristiques voisines de celles de la cholestérol estérase de la sécrétion pancréatique. HERNANDEZ & Coll (42) devaient d'ailleurs montrer que l'activité cholestérol estérifiante d'extraits duodénaux disparaissait complètement en 36 heures chez les rats pancréatectomisés. Pour cette raison, les auteurs avancèrent que l'enzyme était d'origine pancréatique.

L'unanimité ne s'est d'ailleurs pas toujours faite. Si LIN (52) publia que chez le rat l'exclusion du suc pancréatique n'avait que peu d'effets sur l'absorption du cholestérol, BORJA & Coll (16) d'une part et LOSSOW & Coll (53) d'autre part affirmèrent que cette privation réduisait à 20 p 100 de la normale la capacité estérifiante de l'intestin et à 5 p 100 l'absorption du cholestérol en 24 heures.

On attribue généralement à la cholestérol estérase une activité hydrolysante in vivo. En effet, on connaît les valeurs optimales de pH d'activité de l'enzyme : environ 6,2 pour l'estérification et au-delà de 6,6 pour l'hydrolyse (KORZENOVSKY & Coll 49). Il est donc probable qu'au pH de l'intestin, l'hydrolyse des esters de cholestéryle l'emporte sur l'estérification du cholestérol libre.

Cas particulier du lapin.

Le lapin présente une caractéristique très utilisée en recherche pharmacologique : l'aptitude à développer une hypercholestérolémie en présence de régime enrichis en cholestérol.

- le lapin absorbe 80 à 90 p 100 du cholestérol ingéré (21) alors que chez le rat la proportion est de 30 à 50 p 100 (19), chez le chien de 50 à 80 p 100 (29) et chez l'homme de 20 à 50 p 100 (13).

- BEHER & Coll (8) ont étudié la vitesse d'excrétion fécale des stéroïdes marqués après injection intrapéritonéale d'acide mévalonique 2-¹⁴C. Ils ont montré que le lapin éliminait le cholestérol marqué sensi-

blement plus lentement que les autres rongeurs étudiés (rat, souris, cobaye et gerboise), les radioactivités plasmatiques et hépatiques demeurant à un niveau élevé.

Notons que la forte capacité de réabsorption du cholestérol chez le lapin peut masquer une excrétion intestinale abondante si l'on n'utilise que le seul critère de l'élimination fécale.

La principale étude sur le site d'absorption du cholestérol a été menée par BUCHWALD & GERMARD (17) en utilisant la technique "d'intestinal bypass" qui consiste à éliminer chirurgicalement un segment d'intestin en réalisant une boucle obstruée à son extrémité orale. Une diminution de 81 p 100 de l'absorption du cholestérol a été observée chez les lapins avec by-pass iléo-jéjunal et de 86 p 100 avec by-pass iléal inférieur.

Une remarque s'impose : en mettant hors circuit l'iléon, ces auteurs ont pratiquement interrompu le cycle entérohépatique des acides biliaires dont la réabsorption est iléale (18) et déclenché ainsi un drainage de ces acides. Quand on connaît l'importance de ces acides biliaires dans l'absorption du cholestérol (77), il est possible d'attribuer à cette carence la faible absorption qui accompagne le bypass iléal.

Si les travaux sur la recherche du site d'absorption du cholestérol et ses modalités chez le lapin sont peu nombreux, ceux concernant le rôle de la sécrétion pancréatique sont encore plus rares et plus anciens.

Rappelons que la disposition du canal de Wirsung sur l'intestin du lapin présente la particularité de s'aboucher à l'intestin loin du cholédoque, à la fin du duodénum ; d'autre part nous n'avons jamais observé de canal accessoire.

En 1942, FAVARGER (28), qui ne disposait pas des techniques chromatographiques et utilisant comme marqueur l'élaïdate de cholestéryle, a attribué à la sécrétion pancréatique une action estérifiante et au cholestérol un rôle de transporteur d'acides gras. FAVARGER se trouve donc en désaccord avec les auteurs qui ont poursuivi des travaux similaires chez le rat. Etant donné que les esters de cholestéryle ne semblent pas absorbables tels quels, il faudrait admettre que le suc pancréatique peut ralentir l'absorption du cholestérol.

Nous voyons que le rôle précis du suc pancréatique dans l'absorption du cholestérol chez le lapin est loin d'être parfaitement connu. Le but de ce travail est de préciser in vitro et in vivo la part qui revient à la sécrétion pancréatique dans l'apport de cholestérol à l'organisme, ainsi que la signification des processus d'estérification (ou d'hydrolyse) dans l'intestin.

C H A P I T R E I

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I - TECHNIQUES PHYSIOLOGIQUES .

1 - Maintenance des animaux.

Les animaux utilisés sont des lapins mâles albinos de 3 kg environ âgés de 3 à 4 mois provenant d'un élevage industriel.

Les lapins sont placés en batterie automatique et nourris - sauf indications spéciales - ad libitum avec des granulés "Extralabo C 17" (Piétrement) de formule suivante :

. Matières protéiques brutes	: 17	p 100 min.
. Matières grasses	: 2,5	p 100 min.
. Matières cellulosiques	: 12	p 100 max.
. Matières minérales	: 9	p 100 max.
. Humidité	: 14	p 100 max.
. Vitamine A	: 5000	UI/kg
. Vitamine D	: 1000	UI/kg

A leur réception, les animaux sont placés 15 jours en observation avant toute expérimentation.

2 - Prélèvements.

. Sang : pour les quantités supérieures à 3 ml et jusqu'à 12 ml, le sang est prélevé par ponction cardiaque sur seringue héparinée. En dessous de 3 ml, le prélèvement peut être fait à la veine marginale de l'oreille.

. Contenu digestif et muqueuse intestinale : après sacrifice de l'animal par injection intracardiaque de 10 ml d'air, la cavité péritonéale est ouverte et les différents segments du tube digestif délimités par des ligatures. Le contenu intestinal est alors prélevé ; les segments intestinaux sont lavés abondamment au sérum physiologique glacé (au moins 5 rinçages en cas d'utilisation des corps radioactifs) et la muqueuse est récupérée par raclage entre les branches d'une pince sans dents de 30 cm.

3 - Ligature du canal de Wirsung. Les lapins sont placés à jeun 24 heures avant l'opération. On anesthésie à l'aide de Nembutal (30 mg/kg) selon les indications de MURDOCK (59).

L'opération est réalisée dans les conditions d'asepsie chirurgicale. Le canal de Wirsung est repéré et dégagé : il est sectionné entre deux ligatures à un ou deux centimètres au-dessous de son abouchement dans l'intestin.

L'animal reçoit alors 600.000 U de pénicilline et est placé à la diète pendant 24 heures.

4 - Recueil du suc pancréatique. La technique est voisine de celle citée précédemment, mais le lapin ne doit pas être à jeun. Un cathéter de 1 millimètre de diamètre interne est installé dans le canal de Wirsung et ressort sur le dos par tunnélisation.

Le suc est recueilli à 0°C et sur taurocholate de sodium de façon à protéger la cholestérol estérase de l'inactivation trypsique qui selon VAHOUNY est totale en 10 minutes à la température ordinaire (78).

Ce suc est conservé à - 15°C et nous avons pu vérifier que l'activité cholestérol estérasique demeurait inchangée pendant au moins 2 mois.

II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.

Les techniques que nous avons mis en oeuvre peuvent être séparées en 3 parties :

- . Extraction des lipides et séparation par chromatographie en couche mince
- . Dosage des différents lipides dont le cholestérol
- . Techniques de marquage radioactif

1 - Extraction et séparation des lipides.

a) Extraction des lipides.

La littérature abonde en technique utilisant divers solvants ; notre

but était de disposer d'une technique donnant à la fois satisfaction pour les lipides sanguins et les lipides de contenu digestif.

Nous avons choisi la technique de DELSAL (26) au méthylal méthanol car elle permet d'obtenir en une seule fois la dénaturation des protéines et l'extraction des lipides.

- l'échantillon frais est traité par 10 fois son volume de méthylal-méthanol (4 : 1, v/v) en 4 fois.

Après évaporation du solvant, l'extrait, qui, outre les lipides, renferme quelques impuretés (peptides, acides aminés, sucres) est repris par 4 fois 10 ml de méthylal à 40°C, filtré et recueilli dans des ballons tarés. Les ballons sont ensuite placés dans un dessicateur et pesés au moins 12 heures après.

En ce qui concerne les lipémies, la meilleure précision est obtenue en traitant 5 ml de plasma.

. Pour l'extraction du cholestérol des milieux d'incubation "in vitro" une récupération quantitative de toutes les classes lipidiques (phospholipides en particulier) n'est pas exigée.

Nous avons alors utilisé l'extraction à l'alcool-acétone proposée par BEUKERS & Coll (10) qui est beaucoup plus rapide.

. Pour 1 ml de plasma (ou 1 g de milieu d'incubation) ajouter 15 ml d'alcool 95° - acétone (1.1, v/v), agiter, puis rajouter encore 15 ml de solvant. Agiter et centrifuger.

Le surnageant est évaporé à sec et repris dans 1 ml de chloroforme-méthanol (2.1, v/v).

b) Séparation des différentes classes lipidiques.

Nous n'avons mis en oeuvre que des techniques chromatographiques de séparation des "lipides neutres" (terme consacré relativement impropre qui désigne les lipides à l'exclusion des phospholipides).

La chromatographie sur colonne reste largement utilisée, notamment celle de FILLERUP & MEAD (31) mais nous l'avons écartée à cause des problèmes posés à l'opérateur pour les séparations en série (durée, consommation en solvants, etc...). Le seul avantage réside dans la masse relativement importante de lipides qu'il est possible de séparer. Nous avons préféré utiliser la chromatographie sur couche mince en utilisant le protocole décrit par BISERTE (12) ; nous avons néanmoins modifié légèrement le mélange de migration pour le rendre plus polaire afin d'obtenir une meilleure séparation entre TG et AGL.

. Préparation des plaques (STAHL).

25 g de Silicagel G (Merck) sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée jusqu'à homogénéisation parfaite.

Une couche de 0,25 mm d'épaisseur est déposée à l'aide d'un étaleur DESAGA sur 5 plaques de verre de 20 x 20 cm.

On laisse sécher une nuit à la température de la pièce, puis ces plaques sont activées 30 mn à 110°C et conservées au dessiccateur.

. Dépôt : 2 bandes de garde de 2 cm sont tracées de chaque côté de la plaque ; suivant la quantité de lipides déposés nous traçons des couloirs plus ou moins larges. Sur une seule plaque il est possible de séparer une douzaine de mg de lipides.

. Migration : dans les cuves saturées depuis au moins 2 heures du mélange suivant :

. Ether de pétrole	170
. Ether éthylique	30
. Acide acétique	2

La migration est arrêtée lorsque le front est parvenu à 2 cm environ du bord supérieur de la plaque (environ 40 mn).

. Révélation : nous n'employons que des révélateurs non destructifs.

Pour les déterminations de cholestérolémies, nous révélons à l'iode.

Le cholestérol libre réagit très peu, mais les acides gras libres, qui donnent une bande brune, permettent d'encadrer le cholestérol libre entre eux et les phospholipides.

Si l'intégrité de la composition en acides gras doit être respectée (dosage des autres catégories lipidiques) nous pulvérisons une solution alcoolique de Rhodamine B (Merck) à 0,05 p 100. Sous une lampe à ultraviolets les lipides apparaissent sous forme de taches fluorescentes roses sur fond pourpre.

2 - Dosage des différents lipides.

a) Dosage du cholestérol.

Nous procédons d'abord sur l'extrait lipidique purifié à la séparation du cholestérol libre et estérifié puis au dosage du cholestérol.

Le procédé de séparation du cholestérol libre par précipitation avec la digitonine proposé par WINDAUS (82) permet aussi de doser le cholestérol de façon pondérale. Son gros défaut est d'exiger des quantités importantes de cholestérol, par contre sa spécificité vis-à-vis des stérols β 3 - hydroxylés, peut être un avantage par rapport à certaines techniques colorimétriques.

Une technique beaucoup plus moderne est celle du dosage par chromatographie en phase gazeuse ; VANLERENBERGHE & CASSAIGNE (79) utilisent une colonne imprégnée de SE - 52 et comme étalon interne l'acétate de cholestéryle. Le Δ^5 - cholestane est aussi très utilisé à cet effet ainsi que le stigmastérol.

L'intérêt de ces techniques réside dans le fait qu'il est possible de faire la discrimination d'avec d'autres stérols lorsqu'on utilise des colonnes à nombre de plateaux élevé.

Ces techniques peuvent convenir lorsqu'on opère sur des extraits où le cholestérol libre prédomine largement (bile par exemple). Pour des échantillons où le cholestérol estérifié se rencontre en fortes proportions il est intéressant de disposer de techniques spécifiques de la molécule de

cholestérol permettant de doser le cholestérol estérifié sans passer par la laborieuse étape de la saponification.

La réaction de LIEBERMANN & BURCHARD (51), classique, fait apparaître en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique une coloration violette qui vire au vert. C'est sans doute la méthode la plus largement utilisée.

La réaction de SALKOWSKI est obtenue en ajoutant à une solution chloroformique de cholestérol une proportion déterminée d'acide et d'anhydride acétique et d'acide sulfurique. La couche chloroformique supérieure se colore en rouge sang, la couche sulfurique en rouge brun avec fluorescence verte.

La sensibilité de ces réactions a été augmentée par l'adjonction de divers catalyseurs comme les sels de mercure (PESEZ 64) ou les sels de Fer (ZAK 88).

Comme nous dosons toujours le cholestérol supporté par du silicagel nous devons centrifuger, ce qui nous oblige à utiliser des solvants aussi peu volatils que possible ; nous avons adopté la technique de ZAK qui permet d'utiliser l'acide acétique.

Il existe de nombreuses variantes de cette dernière technique quant au choix du sel de fer et des concentrations de la solution ferrique acétique (BEUKERS & Coll, 10) (BADZIO & Coll, 5) qui se caractérisent par leur spécificité vis-à-vis de la moitié stérol des esters (BADZIO 4) et les faibles risques d'interférences (bilirubine et glyoxicholate).

Solution stock : 850 mg de perchlorure de Fer dans 100 ml d'acide acétique.

Solution diluée : 8,5 ml de solution stock complétée à 100 ml avec de l'acide acétique (0,722 mg/ml).

Le silicagel correspondant aux taches de cholestérol libre et estérifié et gratté et recueilli dans des tubes à centrifuger de 12 ml auxquels on rajoute 8 ml de solution diluée.

Après 30 secondes d'agitation, ces tubes sont centrifugés 3 minutes à 4 000 t/mn.

4,8 ml de surnageant sont alors placés dans des tubes à essais. On rajoute 3,2 ml d'acide sulfurique RP et on laisse la coloration se développer 5 mn au bain-marie à 80°C. On obtient une coloration pourpre.

Après refroidissement, la densité optique est mesurée contre un blanc à 546 mμ sur photomètre EPPENDORF.

Etalonnage. Une solution étalon de cholestérol est préparée dans la solution diluée de façon à avoir 160γ pour 8 ml (2 mg/100 ml). Le seuil de sensibilité est inférieur à 5γ et il n'y a besoin d'aucun facteur de correction pour le cholestérol estérifié.

b) Dosage des autres catégories lipidiques.

La littérature abonde en techniques spécifiques permettant de doser la partie insaponifiable de la molécule d'ester d'acide gras. Ainsi détermine-t-on le taux de glycérides par dosage du glycécol par fluorométrie (24), celui des phospholipides par dosage du phosphore (BARTLETT 7) et celui des stérides par dosage du cholestérol. Quant au taux d'acides gras libres, il est obtenu soit par titrimétrie (27) soit colorimétriquement.

L'analyse d'un mélange lipidique complexe oblige donc à mettre en oeuvre une batterie de techniques variées et souvent délicates qui, de plus ne tiennent pas compte de la partie variable de la molécule : les acides gras.

Dans ce cas les techniques globales sont plus appropriées. On peut les diviser en trois catégories : dosage colorimétrique de chaque classe lipidique (AMENTA 1), densitométrie ou planimétrie après carbonisation sur couche mince (GOLMAN & GOODALL 37) ou bien dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, (KUKSIS 50) le cholestérol libre devant être dosé par ailleurs à l'aide d'une technique spécifique.

Nous avons pu constater que les résultats obtenus avec la technique colorimétrique d'AMENTA au sulfochromique étaient assez peu reproductibles,

et, contrairement à ce qu'affirme l'auteur, dépendent du degré d'insaturation des acides gras.

La technique planimétrique est rapide et facile à mettre en oeuvre, mais peu satisfaisante pour les phospholipides qui restent près de la ligne de dépôt.

La troisième méthode présente d'emblée l'avantage d'être sensible et de donner en même temps une information sur la composition en acides gras ; c'est cette dernière que nous avons choisie, en l'adaptant aux problèmes d'analyse qui nous étaient posés.

Les lipides sont séparés par couche mince ; comme les acides gras libres sont présents à des taux très faibles, il est souhaitable de déposer une dizaine de mg de lipides. La révélation se fait sous U.V. après pulvérisation d'une solution alcoolique de Rhodamine B à 0,05 %.

Les différentes taches sont grattées et le silicagel disposé dans les tubes en pyrex de 160 x 15 mn munis d'un bouchon à vis avec joint téflon. Une quantité exactement connue d'étalon interne (acide heptadecanoïque) en solution dans le méthanol est ajoutée au silicagel. C'est là le point délicat, car si l'étalon interne est en trop faible quantité, l'acide heptadecanoïque présent dans l'échantillon, bien que très peu abondant, introduira une erreur non négligeable au moment des interprétations de surface. Un excès d'étalon interne, théoriquement moins dommageable, obligera à changer d'atténuation, ce qui peut introduire aussi des erreurs, assez faibles il est vrai, à moins que l'on ne dispose d'un intégrateur électronique.

Empiriquement, nous avons observé qu'il fallait ajouter entre 20 et 30 p 100 de la masse de lipide estimée ce qui donne un pic de hauteur au moins égale à celle de l'acide palmitique qui est généralement le plus grand.

Les esters méthyliques sont préparés par transméthylation en présence de méthanol-trifluorure de bore selon les indications de MORRISON & SMITH (58).

- Phospholipides, mono et diglycérides et acides gras libres : 5 ml de méthanol-trifluorure de bore 14 % (Merck) pendant 10 mn à 100°C.

- Triglycérides et esters de cholestéryle : 5 ml du mélange méthanol-trifluorure de bore - méthanol - benzène (1.1.1, v/v,v), pendant 45 mn à 100°C. Pour ces échantillons le niveau initial de réactif est repéré et l'absence de fuite contrôlée toutes les 15 minutes.

Après neutralisation par 3 ml de K_2CO_3 à 5 %, les esters méthyliques sont extraits par 2 ml de pentane. L'extrait provenant des triglycérides et des esters de cholestéryle qui contient en outre du benzène, est évaporé à sec sous azote et repris dans 1 ml de pentane : le benzène détériore rapidement la colonne utilisée.

Chromatographie en phase gazeuse (JAMES & MARTIN 46). Les esters méthyliques sont séparés sur colonnes spiralées de 2,5 m de longueur et 1/8e de pouce de diamètre interne remplie de chromosorb W 80 - 100 Mesh imprégné d'EGS (Ethylène-glycol-succinate) à raison de 20 p 100 en poids (WOLFF 83).

L'appareil utilisé est un PERKIN-ELMER 900 équipé de détecteurs à ionisation de flamme ; l'enregistrement se fait sur enregistreur potentiométrique HITACHI 159.

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Isotherme : colonne à 180°C
- Injecteur et Détecteur à 300°C
- Débit de N_2 = 15 ml/mn
- Débit de H_2 et d'air selon les indications du constructeur

Exploitation des chromatogrammes (Tableau 1).

Les acides gras sont identifiés grâce à leurs temps de rétention (temps

Acides	% en poids (p) dans l'étalon	% en surface (S) sur le chromatogramme	P / S ($\pm$ écart - type sur 10 analyses)	coefficient ramené à celui du 17:0	temps de rétention
10 : 0	2,11	1,21	1,744 $\pm$ 0,631	1,696	1 mn 02
12 : 0	2,60	1,97	1,320 $\pm$ 0,309	1,284	1 mn 25
13 : 0	2,15	1,84	1,168 $\pm$ 0,176	1,137	1 mn 42
14 : 0	4,07	3,86	1,054 $\pm$ 0,089	1,025	2 mn 12
15 : 0	2,88	2,67	1,079 $\pm$ 0,133	1,050	2 mn 54
16 : 0	13,53	13,30	1,017 $\pm$ 0,096	0,989	3 mn 42
17 : 0	9,90	9,72	1,028 $\pm$ 0,108	1,000	4 mn 51
18 : 0	13,59	13,21	1,029 $\pm$ 0,079	1,001	6 mn 36
18 : 1	15,31	14,76	1,037 $\pm$ 0,115	1,001	7 mn 18
18 : 2	18,42	18,27	1,008 $\pm$ 0,132	0,980	8 mn 55
18 : 3	15,26	14,83	1,029 $\pm$ 0,092	1,001	11 mn 45

N.B : C 16 : 1 est pris égal à C 16 : 0 (0,989) et 20 : 0 à 18 : 0 (1,001).

Tableau 1 : Détermination des caractéristiques utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

s'écoulant entre l'injection et l'apparition du pic) que l'on compare à ceux de standards.

La surface des pics est mesurée par triangulation. Le poids et le pourcentage de l'étalon interne étant connus, nous pouvons calculer le poids de chaque acide gras.

$$P(x) = \% (x) \times \frac{P(ei)}{\% (ei)}$$

$P(x)$ = poids de l'acide gras x $\% (x)$ = pourcentage en poids de l'acide x

$P(ei)$ = poids de l'étalon interne $\% (ei)$ = " " " de l'étalon interne.

Il est alors possible de calculer le nombre de micromoles de chaque acide gras présent, et, partant, le nombre de μ moles d'insaponifiable correspondant, ainsi que sa masse. On obtient alors le poids de lipide présent dans l'échantillon.

Notons que le poids de phospholipides est calculé en considérant que l'insaponifiable correspond à celui d'une lécithine.

- Facteurs de correction.

La réponse du détecteur varie dans une certaine mesure avec longueur de la chaîne carbonnée de l'acide, aussi est-il nécessaire de déterminer un facteur de correction pour chaque acide (SHEPPARD & Coll 69). Ce facteur est déterminé d'après un étalon de composition exactement connu selon les modalités indiquées dans le tableau 1.

Par commodité, ces facteurs ont été calculés par rapport à celui de l'acide heptadécanoïque pris arbitrairement égal à 1.

- Etude critique de la technique choisie.

Nous avons d'abord testé notre technique sur des mélanges synthétiques puis nous avons comparés les résultats obtenus sur le plasma de lapin à ceux de la littérature.

	% théorique	poids déposé ()	17:0 ajouté (γ)	acides gras % en surface (γ)	17:0 P/S	poids d'acides gras (γ)	moles d'acides gras	moles d'insa- ponif.	poids d'insa- ponif.	total (γ)	% trouvé	rende- ment du dosage
P.L (dipalmitoyl lécithine)	25,82	2110	1000	16:0 = 59,18 17:0 = 40,62 (traces de 18:0 et 18:1)	24,62	1457	5,682	2,841	636	2093	26,31	99,2
A.G.N.E. (acide stéarique)	6,21	540	300	18:0 = 35,01 17:0 = 63,59 (traces de 16:0 et 18:1)	8,57	545	1,915	/	/	545	6,84	100,9
T.G (trioléine)	44,43	3630	1200	14:0 = 1,20 16:0 = 10,41 16:1 = 1,88 18:0 = 7,93 18:1 = 49,49 18:2 = 2,80 17:0 = 26,27	45,68	14:0 = 54,8 16:0 = 475,5 16:1 = 85,9 18:0 = 362,2 18:1 = 2260,6 18:2 = 127,9 3367	0,240 1,854 0,338 1,273 8,002 0,456 12,163	4,054	166	3533	44,41	97,3
E.C (palmitate de cholestéryle)	23,13	1890	800	16:0 = 46,70 18:0 = 1,10 17:0 = 52,18	15,33	16:0 = 715,9 18:0 = 16,9 733	2,792 0,059 2,851	2,851	1051	1784	22,42	94,4
		8170γ								7995γ		97,4

Figure 2 - Exemple d'analyse d'un mélange étalon par la technique
de dosage des acides gras par CPG.

	Auteurs (1971)	LUTTON & TSALTAS (1965)	WANG & COLL (1954)	POPJAK (1946)
Phospholipides (méthode dosage)	26,4 % (CPG des acides gras)	30,0 % (STEWART & HENDRY)	29,4 (FISKE & SUBBAROW)	35,4 % (BLOOR)
Cholestérol libre (méthode dosage)	7,6 % (ZAK & SLATKIS)	3,7 % (SPERRY & WEBB)	3,4 % (SPERRY & SCHOENHEIMER)	8,5 % (POPJAK)
Acides gras libres (méthode dosage)	3,8 % (CPG des acides gras)	1,3 % (DOLE)	?	?
Triglycérides (méthode dosage)	36,0 % (CPG des acides gras)	38,2 % (par différence)	48,6 % (par différence)	25,3 % (saponification (puis par différence)
Esters de cholestéryle (méthode dosage)	26,1 % (CPG + ZAK & ZLATKIS)	21,6 % (SPERRY & WEBB)	18,6 % (SPERRY & SCHOENHEIMER)	29,5 % (POPJAK)
Lipémie (g/l) (méthode dosage)	3,59 (♂) (DELSAL)	2,83 (♂) et 3,46 (♀) (BLOOR)	3,50 (BLOOR)	2,80 (BLOOR)

Tableau 3 - Teneur en lipides plasmatique et composition de ces lipides chez les lapins normaux (4 analyses).
 Comparaison avec différents auteurs.

Mélange synthétique (Tableau 2).

Nous avons choisi des esters d'acides gras différents entre deux classes de migration voisine afin de détecter des interférences éventuelles lors de la chromatographie sur couche mince.

La "trioléine" utilisée est assez hétérogène quant à sa composition en acides gras ; nous ne pouvons donc pas préjuger d'une contamination éventuelle de cette fraction par les AGNE. Toutefois, l'absence d'acides étrangers dans la fraction AGNE et la récupération presque exacte de la quantité déposée plaident en faveur d'une séparation correcte.

Le taux de récupération, très bon pour les PL et les AGNE est un peu plus faible pour les TG et les EC. Ce fait peut être dû à la faible solubilité de ces dernières fractions dans le méthanol à laquelle on pallie en ajoutant du benzène (MORRISON & SMITH 58) ; les esters de cholestéryle saturés étant les plus difficiles à transméthyliser. Dans les produits naturels ces esters sont souvent très insaturés, aussi peut-on considérer le rendement obtenu ici comme une limite inférieure.

Comparaison avec les données de la littérature sur les lipides plasmatiques (Tableau 3).

Les divergences sont assez grandes entre les auteurs : de toute manière de nombreux facteurs non contrôlés peuvent introduire des variations ; différence de technique, de variété de lapin, de sexe (LUTTON & TSALTAS 55) ou bien d'état de nutrition.

La différence la plus faible est observée entre nos résultats et ceux de LUTTON & TSALTAS, relativement récents.

3 - Techniques de marquage radioactif.

a) Principe général du comptage par scintillation liquide.

Les deux isotopes que nous utiliserons (^3H et ^{14}C) se désintègrent avec transformation d'un neutron du noyau en proton et émission d'un électron (émission β^-).

Transformation de l'énergie des particules β en photons.

- L'énergie de la particule β est transférée sur le solvant (toluène dans le cas qui nous intéresse) dont les molécules passent à un état excité.

- Cette énergie d'excitation est transférée sur les molécules du scintillateur primaire PPO (2,5 diphényloxazole).

- Les molécules excitées du scintillateur reviennent à leur niveau d'énergie initial en émettant des quantas de lumière dans le visible ou le proche ultraviolet.

Le maximum d'émission du PPO se situe vers $3800 \text{ \AA}$ ce qui se situe au-dessous des longueurs d'onde de sensibilité maximale des photocathodes couramment employées. Il faut donc ajouter un scintillateur secondaire qui a pour rôle d'absorber la lumière émise par le scintillateur primaire et de la réémettre à une longueur d'onde supérieure. Le POPOP (2 - p - phénylène - bis (5 - phényloxazole)) que nous employons a son maximum d'émission vers $4200 \text{ \AA}$.

Détection des scintillations.

Les quantas lumineux provoquent l'émission d'électrons par la surface sensible d'une photocathode.

Ces électrons sont accélérés par un potentiel d'environ 100 V par une première dynode où chaque photoélectron déclenche la libération de 3 à 5 électrons secondaires ; ces derniers vont à leur tour frapper une seconde dynode, ce qui donne lieu à une deuxième amplification. Les photomultiplicateurs couramment employés comportent 10 à 14 étages d'amplification.

Le courant final collecté à l'anode est converti en impulsions de voltage qui peuvent être comptées et intégrées.

Analyse de l'intensité des impulsions et bruit de fond.

Le comptage par scintillation est un comptage proportionnel, c'est-à-dire que l'importance du signal de sortie du détecteur est proportionnelle à l'énergie transmise par la particule au détecteur.

Le signal reçu et amplifié peut être traité dans un analyseur qui le compare avec des voltages de référence. Un discriminateur laisse alors passer le signal s'il tombe entre 2 voltages sélectionnés qui définissent un canal (ou fenêtre de voltage) et le rejettent dans le cas contraire (comptage différentiel).

Pour la mesure de faibles activités il est indispensable de réduire au maximum le bruit de fond. Ses origines, diverses, sont consignées dans le tableau suivant :

Contenu de la chambre de comptage	R (cpm)		Principale origine de l'émission	Procédé de diminution du B.F correspondant
	0 - 5 V	0 - 80V		
- Changeur d'échantillon	1,6	2,8	Emission thermionique	Refroidissement de l'ensemble de comptage
- Vide	12,0	18,8	Phosphorescence spontanée	Enceinte close, obscurité totale. Circuit d'anti-coïncidence
- Pot scintillat vide	25,2	34,5	K^{40}	Verres spéciaux borosilicatés à faible teneur en K
- Pot + 15 ml toluène	28,3	45,9	Radiation de CERENKOV	Blindage
- Pot + 15 ml scintillant	33,5	88,5	Radioactivité de l'environnement et radiations cosmiques	Usage de solvants d'origine fossile (faible teneur en ^{14}C + Blindage

* Documentation PACKARD.

b) Comptage d'un seul émetteur avec détermination du quenching par la méthode du rapport de canaux.

Principe.

Le nombre d'impulsions observées (une fois retranché le bruit de fond) est inférieur au nombre de désintégrations réel dans l'échantillon pour les émetteurs β faibles que nous utilisons. Cette différence provient de nombreux facteurs (FUNT & HETHERINGTON 34).

- d'une part des facteurs relativement contrôlables provenant du matériel de comptage (réabsorption des photons par la solution de scintillation, efficacité de la conversion de l'énergie de radiation par les scintillateurs, performances du système de collection des éclairs, etc...).

- d'autre part de substances apportées par l'échantillon et dont la présence n'est guère contrôlable (absorption de photons par certains groupements de substances de l'échantillon).

Il est indispensable de pouvoir déterminer l'importance de la perte d'efficacité du comptage ("quenching") pour chaque pot. Pour ce faire nous avons choisi la technique du rapport de canaux pour laquelle aucune manipulation de l'échantillon n'est nécessaire (BUSCH 18). Son principe est le suivant :

Deux canaux sont réglés de façon à ne compter dans le premier que les désintégrations d'énergie les plus faibles (b) et dans l'autre pratiquement toutes les désintégrations du spectre d'émission (c). Le quenching ayant pour effet de comprimer le spectre des énergies vers 0, le rapport b/c augmentera avec le "quenching".

On obtient une relation linéaire $\text{rendement} = f(b/c)$ à l'aide d'une source étalon que l'on quenche le plus en plus.

Comptage.

Liquide de scintillation

- . 3 g PPO (2,5 diphényloxazole)
- . 0,1 g POPOP (1,4 - bis - 5 - phényl - oxazolyl benzène)
- . toluène (Merck pour analyse) q.s.p. pour 1 l.

Les comptages sont effectués dans des pots à basse teneur en potassium remplis de 10 ml de scintillant à partir de Silicagel dans élution (HOUX 45) les rendements sont néanmoins corrects (40 p 100 et plus pour 3H).

Nous avons utilisé un spectromètre PACKARD Modèle 2311 réglé pour 3H de la façon suivante :

- . canal rouge : gain 5, fenêtre A - B (A = 0,50 et B = 0,0)
- . canal vert : gain 5, fenêtre C - D (C = 0,0 et D = 2,10)

La droite de régression a été déterminée pour la fonction rendement $= f(b/c)$ et les calculs sont programmés sur Olivetti Programma 101.

c) Double comptage avec détermination du quenching par standardisation externe.

Principe.

Il est possible de compter séparément dans un même échantillon ^3H et ^{14}C grâce aux différences d'énergie de leurs désintégrations.

$$\begin{array}{lcl} ^3\text{H} & : & \bar{E} = 0,0055 \text{ MeV} \text{ et } E_{\text{max}} = 0,0180 \text{ MeV} \\ ^{14}\text{C} & : & \bar{E} = 0,050 \text{ MeV} \text{ et } E_{\text{max}} = 0,156 \text{ MeV} \end{array}$$

En sélectionnant convenablement les canaux, on peut compter séparément les deux émetteurs. En ce qui concerne le ^{14}C , on ne compte délibérément qu'une partie de ses désintégrations ; il est indispensable de connaître le rendement de comptage dans ce canal d'une part pour obtenir les dpm du ^{14}C , d'autre part pour pouvoir calculer les cpm à retrancher dans le canal tritium (OKITA & Coll 63).

La standardisation externe consiste en un comptage en travers du pot, puis sans le pot d'une source à longue période (Américium 241, Radium 226). On obtient ainsi un rapport caractéristique qui tend vers 1 lorsque le Quenching tend vers 0 (HIGASHIMURA 44).

Etalonnage.

Nous avons utilisé un spectromètre TRI-CARB PACKARD Modèle 3380 placé sur les canaux préréglés.

Pour des rapports de canaux inférieurs à 0,5 environ (c'est-à-dire assez fortement quenchés) le ^{14}C est compté massivement dans le canal ^3H . Les positions préréglées ne conviennent alors plus et il faut procéder soi-même à un réglage des fenêtres pour retrouver une discrimination correcte entre ^3H et ^{14}C .

Comptage.

Conditions identiques à celle du simple marquage en ce qui concerne la préparation des pots. Ceux-ci sont en général très faiblement quenchés, aussi pouvons-nous utiliser les canaux préréglés.

d) Synthèse d'esters de cholestéryle radioactifs.

Généralités.

Il est pratiquement indispensable de pouvoir préparer au laboratoire les esters de cholestéryle marqués. Les quelques firmes fabriquant ces corps les vendent à des prix très élevés et offrent un choix restreint d'esters.

Il existe plusieurs techniques de synthèse :

- par les chlorures d'acyle : on fait réagir le chlorure de l'acide choisi sur l'hydroxyle du cholestérol en présence d'un solvant basique (pyridine en général) destiné à éliminer l'HCl formé.

Les chlorures d'acides insaturés doivent être préparés au laboratoire ; WOOD (85) a montré qu'à cet effet le chlorure d'oxylyle devait être préféré au chlorure de thionyle. L'étape délicate se situe au moment de la purification du chlorure d'acyle ; on tend à substituer à la distillation un lavage par une solution chlorhydrique glacée.

Une technique d'échange isotopique a été proposée par BORGSTRÖM & KRABISCH (14) pour obtenir des esters marqués sur l'acide gras. L'inconvénient réside dans la forte dilution de l'activité spécifique de l'acide gras (600 fois environ).

- par interestérification (MAHADEVAN & LUNDBERG 56). L'échange se fait entre l'acétate de cholestéryle et l'ester méthylique de l'acide gras catalysé par l'éthylate de sodium. Cette technique, assez longue, peut être intéressante lorsque le chlorure de l'acide est difficile à préparer (acides très insaturés).

- par voie enzymatique. Des esters insaturés ont pu être préparés avec des extraits pancréatiques et SWELL & TREADWELL (74) ont obtenu des quantités de l'ordre du milligramme d'esters de cholestéryle radioactifs. Cette méthode ne donne de résultats satisfaisants que pour les acides insaturés à chaîne longue (C_{16} et C_{18}). On peut obtenir de fortes radioactivités spécifiques, et, le cas échéant, préparer des esters doublement marqués ; d'autre part les produits en excès sont aisément récupérables.

Nous avons choisi cette technique car elle dispense de l'emploi d'intermédiaires caustiques ou instables et elle est sensiblement plus rapide.

Protocole.

La technique d'incubation est inspirée de celle proposée par SHAH & Coll (68) sauf que la proportion d'acides gras a été augmentée afin d'assurer une estérification aussi complète que possible.

Dans un ballon de 100 ml à col rodé :

- 5 μ moles de cholestérol : le cholestérol radioactif est complété à 1,93 mg avec du cholestérol froid (purissimum FluKa).

- 16 μ moles d'acide gras (spécialement pur BDH).

Chaque substrat est dissout dans 0,2 ml d'acétone. On ajoute d'abord 10 mg de taurocholate de Na (Sigma) dissouts dans 0,1 ml de tampon phosphate de K 0,1 M pH 6,2, puis 3,5 ml de ce tampon.

Le milieu est homogénéisé 1 heure au bain-marie à 40°C à agitation. On ajoute alors 300 μ l de suc pancréatique (2,7 mg de protéine) et on incube 5 heures à 37°C à agitation constante.

Les lipides sont extraits à l'alcool acétone 1:1 et le cholestérol estérifié est séparé des autres constituants lipidiques par chromatographie préparative sur couche mince de 0,5 mm d'épaisseur. L'ester est élué par 3 fois 10 ml de chloroforme-méthanol 2:1, v/v. Le solvant est évaporé et l'ester est repris par du toluène et conservé à - 20°C.

C H A P I T R E II

L'INFLUENCE DE LA LIGATURE DU CANAL DE WIRSUNG SUR L'APPORT DE CHOLESTEROL A L'ORGANISME

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Nous avons disposé 4 lots de 4 lapins de la façon suivante :

- . 4 lapins non opérés
- . 4 lapins privés de sécrétion pancréatique) régime normal
- . 4 lapins non opérés
- . 4 lapins privés de sécrétion pancréatique) régime hypercholestérolé

Le régime hypercholestérolé consiste dans l'administration quotidienne de 1 g de cholestérol qui a été fixé sur les granulés après dissolution dans l'éther éthylique.

Chaque semaine un prélèvement de sang a été réalisé dans des conditions identiques. Sur les lipides extraits par la technique de DELSAL ont été mesurées les lipémies et les cholestérolémies.

A la sixième semaine nous avons déterminé la composition des lipides plasmatiques ainsi que la composition en acides gras des lipides séparés.

II - RESULTATS.

1 - Lipémies -(Figure 1).

Chez les animaux soumis à un régime normal nous n'observons aucune différence significative entre les témoins et les animaux opérés bien que chez ces derniers les lipémies se maintiennent à un niveau légèrement inférieur.

L'augmentation des lipémies induites par le régime hypercholestérolé diffère profondément entre le lot des lapins sans sécrétion pancréatique et celui des lapins non opérés.

Chez les lapins non opérés la lipémie croît de façon pratiquement linéaire jusqu'à la quatrième semaine passant de 3,59 g/l à 21,99 g/l.

Δ = LOT A
 ∇ = LOT B
 $\square$ = LOT C
 $\blacksquare$ = LOT D

LIPÉMIES
 (G/L)

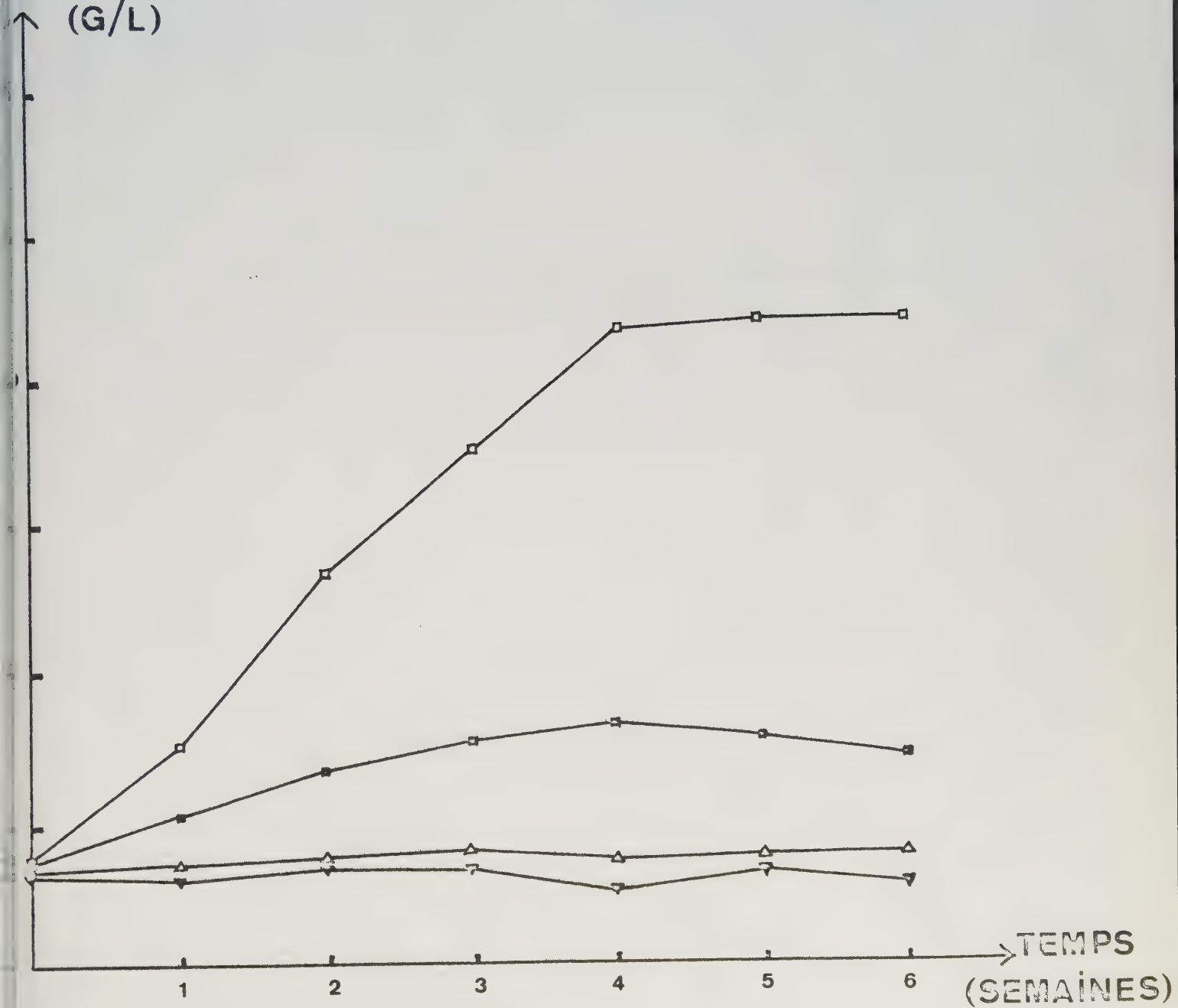
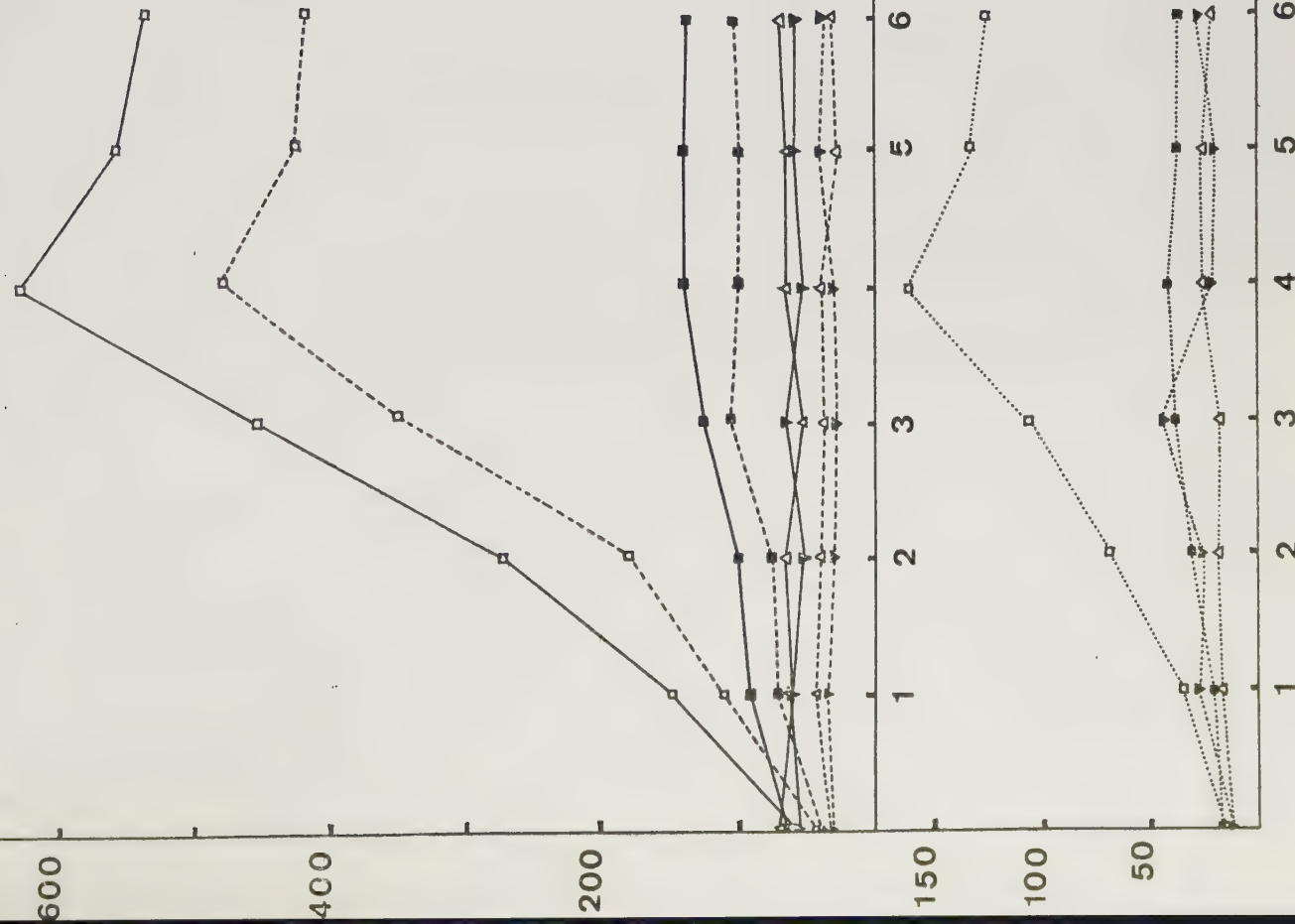


FIG 1 : VARIATIONS DES LIPÉMIES EN FONCTION DU
 TEMPS DE TRAITEMENT

CHOLESTÉROLÉMIÉS

(MG / 100 ML)

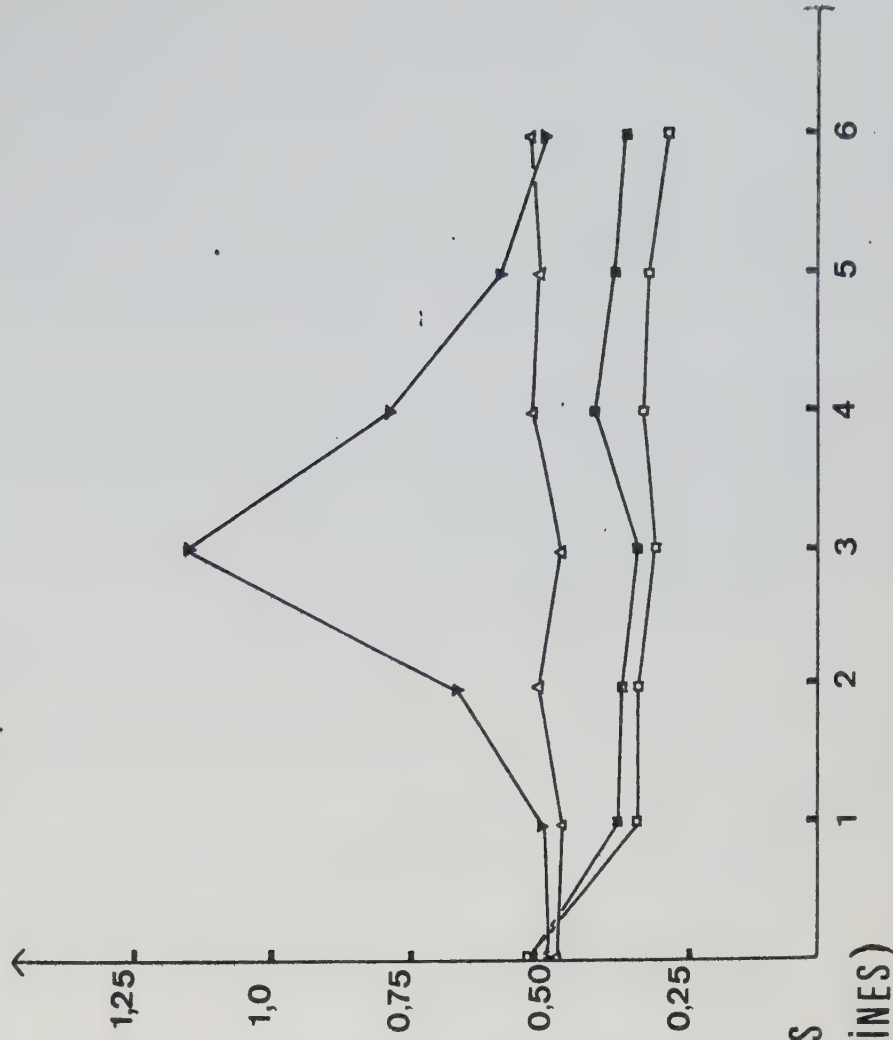


LEGENDE

CHOLESTÉROLÉMIÉS TOTALES
CHOLESTÉROLÉMIÉS ESTÉRIFIÉES
CHOLESTÉROLÉMIÉS LIBRES

Δ : LOT A
▽ : LOT B
□ : LOT C
■ : LOT D

RAPPORT C_L / C_E



TEMPS
(SEMAINES)

A ce moment se manifeste une stabilisation autour de 22 g/l. A partir de la seconde semaine de traitement les différences entre les valeurs des témoins et celles du lot opéré deviennent significatives ; le plasma prend alors un aspect latescent.

Chez les lapins sans sécrétion pancréatique la lipémie croît également de façon linéaire, passant par un maximum à la quatrième semaine. La pente de la droite est beaucoup plus faible puisque la lipémie passe de 3,47 à 8,13 g/l pour la quatrième semaine. Du fait de la dispersion relativement forte des valeurs individuelles, la différence avec les témoins n'est significative que pour les quatre premières semaines.

2 - Cholestérolémies (Figure 2).

Pour les deux lots de lapins soumis au régime normal, la cholestérolémie totale ne varie pratiquement pas et se maintient autour de 60 mg/100 ml. Le rapport cholestérol libre / cholestérol estérifié, d'environ 0,50 chez les témoins s'élève chez les lapins privés de sécrétion pancréatique jusqu'à 1,15 à la troisième semaine puis revient à la normale lors des deux dernières semaines.

Chez les lapins soumis au régime hypercholestérolé, la cholestérolémie augmente de façon notable.

Avec les lapins non opérés la cholestérolémie totale croît de façon spectaculaire puisqu'elle passe de 61,6 à 637, 5 mg/100 ml puis se stabilise vers 550 mg/100ml. Le rapport C_L/C_E diminue d'emblée de 0,53 à 0,34 (première semaine) et va se fixer autour de 0,30. L'augmentation de la cholestérolémie estérifiée - de 44,5 à 481,8 mg/100 ml - rend donc compte pour une large part de l'augmentation de la cholestérolémie totale. Toutes ces cholestérolémies diffèrent significativement des témoins dès la première semaine, à l'exception de la cholestérolémie libre (2e semaine).

Chez les lapins opérés l'augmentation de cholestérolémie totale est beaucoup plus modérée, de 57,6 à 138,9 mg/100 ml pour la cinquième semaine. Le rapport CL/CE varie sensiblement comme dans le lot précédent (de 0,53 à 0,35), c'est-à-dire que là encore, c'est la cholestérolémie estérifiée qui subit la plus forte augmentation. La différence de la cholestérolémie totale n'est significative que pour la quatrième et la cinquième semaine ; pour la

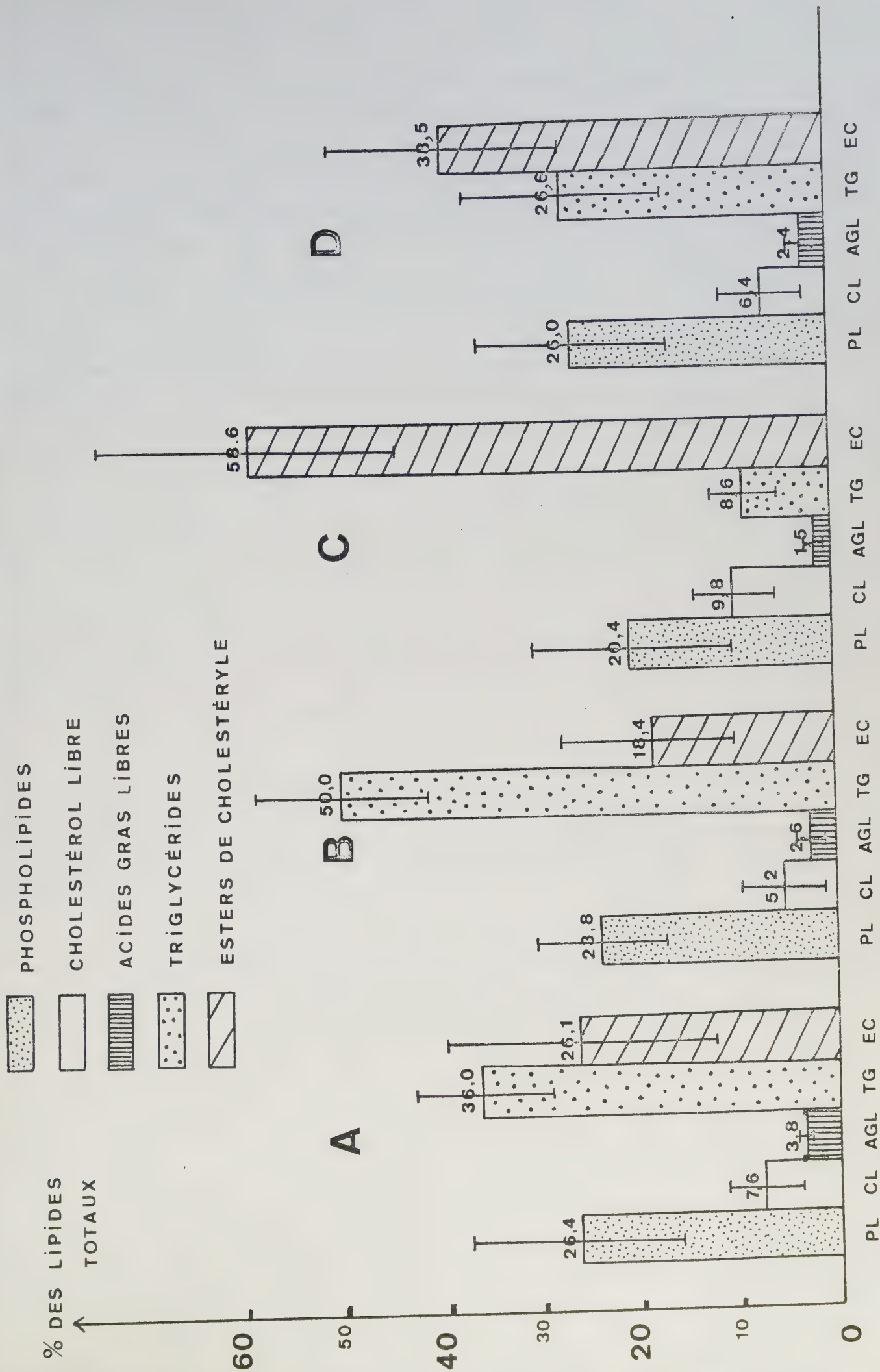


FIG 3 : COMPOSITION DES LIPIDES PLASMATIQUES

cholestérolémie estérifiée les quatre dernières semaines ; quant à la cholestérolémie libre que pour la quatrième semaine.

Entre les deux lots de lapins hypercholestérolémiques toutes les cholestérolémies diffèrent significativement excepté les cholestérolémies libres de la première semaine.

3 - Composition des lipides plasmatiques (Figure 3).

Le taux des phospholipides varie peu, ce qui indique que la courbe des phospholipidémies tend à reproduire celle des lipémies. Notons cependant une diminution légère et non significative chez les lapins hypercholestérolémiques du lot C.

Le taux des acides gras libres diminue dans les lots B, C et D par rapport aux témoins, mais ces différences ne sont pas significatives.

Le taux des triglycérides varie fortement selon les groupes. Il diffère significativement entre les lots A et C, B et C, B et D. L'écart entre A et B (36,0 et 50,0), bien que non significatif de justesse au seuil $\alpha = 0,05$, peut sous certaines réserves, être pris en considération.

Dans le lot C la diminution est particulièrement forte (de 4 fois), mais comme les lipémies ont été multipliées par 6 environ la triglycéridémie augmente tout de même de 50 p 100. Dans le lot D, la diminution est plus faible (de 1/4 environ) ; l'augmentation de la triglycéridémie reste alors très modérée.

Chez les lapins hypercholestérolémiques, l'augmentation très importante du taux des esters de cholestéryle rend compte en grande partie de l'élévation de la lipémie et de la cholestérolémie. Chez les lapins privés de sécrétion pancréatique soumis au régime normal, nous constatons par contre une chute notable. Sont significatives les différences entre les lots B et C ; entre les témoins et le lot C la différence serait significative au seuil $\alpha = 0,10$ environ.

Les taux de triglycérides et d'esters de cholestéryle semblent étroitement liés ; la somme p 100 TG + p 100 EC varie remarquablement peu parmi les quatre lots puisque nous avons A (62,1), B (68,4), C (67,2) et D (65,1).

EN POIDS DES ACIDES GRAS

1 = 10:0 5 = 10:0 9 = 18:1
 2 = 12:0 6 = 16:1 10 = 18:2
 3 = 14:0 7 = 17:1? 11 = 20:0
 4 = 15:0 8 = 18:0 12 = 18:3

PL

A

B

C

D

AGNE

A

B

C

D

TG

A

B

C

D

EC

A

B

C

D

Fig4: COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES PLASMATIQUES

Le taux de cholestérol libre tend à diminuer dans le lot B et à augmenter dans le lot C par rapport aux témoins, mais ces différences ne sont pas significatives.

4 - Composition en acides gras des lipides plasmatiques (Figure 4).

Si l'on excepte les fluctuations de l'acide caprique, laurique et linoléique dans les AGNE et dont la signification est incertaine, les principales variations ne se manifestent qu'au niveau des esters de cholestéryle.

Ces modifications affectent le groupe des acides à 18 atomes de carbone. Les acides stéarique et oléique d'une part et l'acide linoléique qui constitue de loin l'acide le plus abondant de cette fraction chez le lapin normal.

C'est ainsi que le rapport $C_{18 : 1} / C_{18 : 2}$ égal à 0,63 chez les témoins et 0,64 dans le lot B passe à 1,63 dans le lot C et 1,56 dans le lot D, c'est-à-dire qu'il s'inverse.

Il faut noter que les lapins privés de sécrétion pancréatique et soumis à un régime normal présentent des quantités notables d'acide arachidique dans certaines fractions, notamment les esters de cholestéryle et les AGNE.

III - DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS.

La privation de sécrétion pancréatique, avec un régime normal, a peu de conséquences sur l'apport lipidique et en cholestérol à l'organisme. Le régime hypercholestérolé fait office de révélateur et permet de voir que la ligature du canal de Wirsung protège efficacement le lapin contre l'hypercholestérolémie et l'hyperlipémie induites par ce régime.

Si on considère les cholestérolémies, on constate que dans les deux lots de lapins recevant le régime enrichi en cholestérol, l'augmentation est surtout due aux esters. Les résultats, en ce qui concerne les lapins non opérés, recourent ceux publiés par WANG (80) et par POPJAK (65), ce dernier rapportant des rapports CL/CE de 0,28 environ dans des conditions expérimentales voisines. Remarquons que ces données contredisent celles de WELLS & RONGONE (81) qui ont donné des augmentations localisées presque exclusivement dans la fraction libre, leur rapport CL/CE atteignant 3,16.

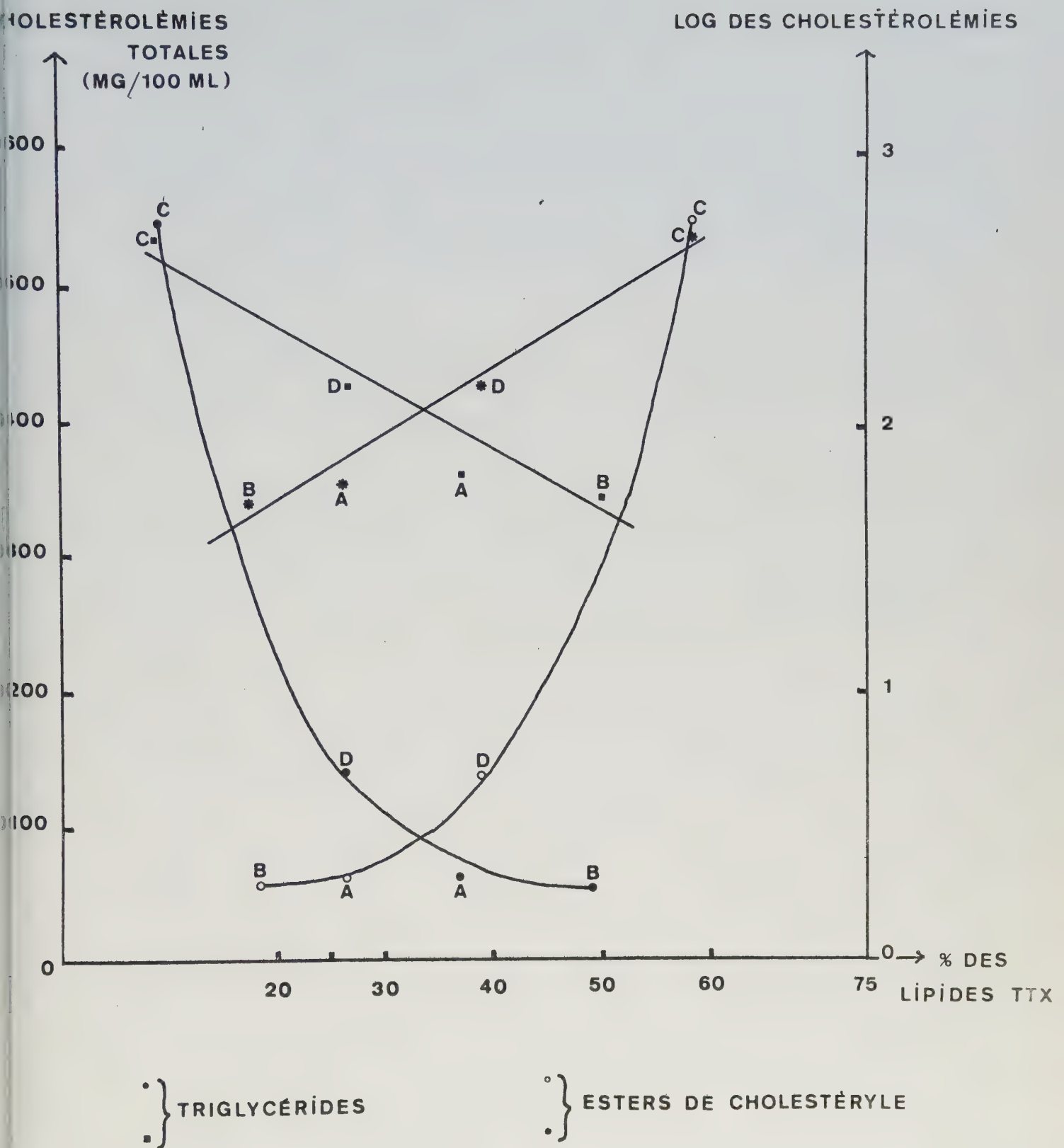


FIG 5 : RELATIONS ENTRE LES POURCENTAGES EN TRIGLYCÉRIDES ET EN ESTERS DE CHOLESTÉRYLE DANS LES LIPIDES PLASMATIQUES ET LES CHOLESTÉROLEMIES TOTALES.

Le profil des lipides plasmatiques des différents lots montre que les variations sont presque exclusivement localisées sur le couple triglycérides et esters de cholestéryle. Nous avons tracé pour ces deux classes de lipides les courbes $p\ 100$ des lipides $ttx = f$ (cholestérolémie totale) ; ces relations sont d'allure exponentielle ; en prenant le logarithme des cholestérolémies totales, nous obtenons des relations linéaires. POPJAK de son côté avait déjà obtenu des relations de ce type entre la cholestérolémie libre et les autres catégories lipidiques (phospholipides, acides gras des lipides neutres).

Ces courbes nous montrent, comme c'est le cas dans les lots B et D, que des faibles variations de cholestérolémie peuvent conduire à des remaniements profonds du profil lipidique.

L'examen de la composition en acides gras des lipides plasmatiques confirme cette tendance. Les variations importantes, localisées aux esters de cholestéryle, se distinguent surtout par l'inversion du rapport $C_{18} : 2 / C_{18} : 1$ qui s'inverse chez les lapins hypercholestérolémiques : nous retrouvons là les modifications signalées par ZILVERSMIT & SWEETLEY (86) dans des conditions comparables.

Ces modifications du chromatogramme des acides en C_{18} semblent en corrélation étroite avec les élévations de cholestérolémie. Comme la ligature du canal de Wirsung, qui perturbe profondément l'absorption des acides gras, n'altère guère ce phénomène, il est vraisemblable que ces acides sont d'origine endogène. POPJAK (65) a attribué aux triglycérides des réserves graisseuses dont il a observé la fonte, le rôle de donneurs d'acides gras. On observe dans ces réserves le rapport $C_{18} : 2 / C_{18} : 1$ d'environ 0,7 caractéristique, mais la forte proportion d'acide palmitique (30 à 35 p 100) ne se retrouve pas dans les esters de cholestéryle (16 à 18 p 100). Depuis, les lécithines ont été reconnues comme le donneur d'acide gras en β . Il faut toutefois constater que les variations en acides gras des esters de cholestéryle n'ont guère de retentissement au niveau des phospholipides dont la composition en acide gras reste assez stable.

Le problème de l'origine des acides gras estérifiant le cholestérol ainsi que celui de la signification de leurs variations reste posé.

La privation de sécrétion pancréatique n'annule pas totalement l'absorption du cholestérol mais elle la limite néanmoins considérablement.

Même réduite à un faible pourcentage de la normale, cette absorption n'en garde pas moins une importance certaine en raison de l'abondance du cholestérol administré. Une comparaison entre les pentes des courbes de cholestérolémie totale (pratiquement linéaires en fonction du temps pour les trois premières semaines) donne un rapport :

$$\frac{\text{pente courbe lapins opérés}}{\text{pente courbe lapins non opérés}} \quad \text{de } 0,15.$$

Ce rapport indique que les possibilités d'assimilation du cholestérol par l'organisme in toto, et dans les conditions utilisées, est réduite d'environ 6,5 fois ; l'action sur l'absorption intestinale étant selon toute vraisemblance primordiale. Chez le chien, ARRIGO & MONTINI (2) ont d'ailleurs mis en évidence une excrétion accrue du cholestérol, même d'origine endogène.

L'utilisation du régime hypercholestérolé permet de dégager l'influence de la sécrétion pancréatique, alors que l'étude des cholestérolémies sur les lapins recevant un régime normal ne montre pas de changements probants du fait des mécanismes de régulation de la synthèse du cholestérol. Tous les mammifères peuvent en effet subsister avec des régimes totalement dépourvus de cholestérol (11). Des expériences utilisant des rations non enrichies en cholestérol ont été tentées sur d'autres espèces. Chez l'homme, dans des conditions assez particulières, (absence congénitale de pancréas), BELL (9) a observé des baisses de cholestérolémie, mais chez le chien dépancréaté aucun effet n'a pu être démontré (LIN & KARVINEN 52).

C H A P I T R E I I I

ETUDE IN VIVO DE L'INFLUENCE DE LA SECRETION PANCREATIQUE SUR LE SORT DU CHOLESTEROL ET DE SES ESTERS DANS L'INTESTIN

I - ETUDE DU SORT DU CHOLESTEROL LIBRE OU ESTERIFIE DANS LE CONTENU INTESTINAL.

1 - Protocole expérimental.

a) Principe.

Nous administrons à des lapins intacts ou au canal de Wirsung ligaturé une émulsion de cholestérol libre ou estérifié marqué au tritium sur le cholestérol (marquage général).

Nous ne mesurons pas le rendement global de l'absorption, ce qui nous obligerait à procéder par cathétérisme du canal thoracique (ZILVERSMIT 87), mais à des prélèvements à différents intervalles de temps du contenu intestinal. Nos analyses portent sur des portions aliquotes de ce contenu sur lequel nous déterminons la radioactivité spécifique.

Ce protocole, s'il ne donne pas de résultats globaux, permet d'avoir un cliché de la répartition dans le contenu intestinal de la dose traceuse ainsi que des échanges entre les deux fractions cholestérolées.

b) Préparation de l'émulsion.

L'oléate de cholestéryle tritié (radioactivité sur le cholestérol) est préparé selon la méthode précédemment décrite à partir du cholestérol (^3H)_G (pp 22).

- 5 μCi de cholestérol (^3H)_G libre, ou sous forme d'oléate, en solution dans le toluène, sont placés dans un ballon de 100 ml à col rodé (A).

Le toluène est évaporé à 40°C sous courant d'azote et le marqueur est repris dans 0,2 ml d'acétone ; sa masse est considérée comme négligeable. On ajoute 10 mg de taurocholate de sodium (Sigma) dans 0,5 ml d'eau distillée ; l'émulsion est homogénéisée 30 mn au bain-marie à agitation à 38°C.

- Dans un second ballon (B) 80 mg de cholestérol (purissimum Fluka) ou 138 mg d'oléate de cholestéryle (BDH) sont dissous dans 2 ml d'éther éthylique. On ajoute 50 mg de taurocholate de sodium dans 1 ml d'eau distillée puis 8,5 ml d'eau distillée.

L'ensemble est homogénéisé à l'ultraturax (20 000 t/mn) 2 fois 10 secondes.

Le contenu de B est versé dans A et le mélange est placé au bain-marie à 38°C à agitation jusqu'à disparition de l'odeur d'éther.

On obtient ainsi une émulsion latescente stable au moins un mois à + 2°C ; la radioactivité spécifique est de 137 500 dmp/mg de cholestérol.

c) Administration et prélèvements.

Les animaux sont mis à jeun 24 heures avant l'administration de l'émulsion contenant le cholestérol radioactif.

L'émulsion (10 ml par animal) est introduite par sondage naso oesophagien ; la sonde et la seringue sont ensuite rincées avec 2 ml d'eau distillée.

Des essais préliminaires nous ont montré que la vidange gastrique n'intervenait en général qu'au bout de 30 à 45 mn. D'autre part, dans le cas le plus favorable (lapins non opérés ayant reçu du cholestérol libre) la radioactivité du contenu intestinal devenait très faible au-delà de 3 heures. Les prélèvements sont donc effectués au temps 45 mn, 1 h 30 et 3 heures après administration de l'émulsion, les animaux étant sacrifiés par injection intraventriculaire de 15 ml d'air.

Après homogénéisation, nous prélevons 2 grammes de matière fraîche dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, le l'iléon, le caecum et le côlon.

d) Dosages sur les contenus digestifs.

Les lipides sont extraits par la technique de DELSAL (26) au méthylal-méthanol.

	ETAT DU CHOLE- TEROL	CONTENU GASTRIQUE		CONTENU DUODENAL		CONTENU JEJUNAL		CONTENU ILEAL		CONTENU CAECAL		CONTENU COLIQUE	
		radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact (dpm)	rad. Spéc. (dpm/mg)
PRELEVEMENTS à 45 minutes	LIBRE	114.374		7.716		5.197		225		31		21	
		84.098		5.881		5.499		1.200		287		120	
	ESTERIF.	55		1.043		344		32		23		0	
		261		7.725		3.440		1.718		333		0	
PRELEVEMENTS à 90 minutes	LIBRE	55.910		5.575		19.772		5.264		1.232		151	
		77.653		32.794		48.699		16.197		5.867		517	
	ESTERIF.	58		54		68		43		74		94	
		644		658		674		374		1.061		693	
PRELEVEMENTS à 180 minutes	LIBRE	954		573		977		1.024		652		145	
		1.760		2.265		2.605		2.381		749		614	
	ESTERIF.	53		451		56		66		65		88	
		1.631		3.523		500		629		511		846	

Tableau 4 - Métabolisme intestinal de 80 mg de cholestérol tritié (5 μ Ci) chez le lapin normal (N = 3).

ETAT DU CHOLE- STEROL	CONTENU GASTRIQUE radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU DUODENAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm mg)	CONTENU JEJUNAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm mg)	CONTENU ILEAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm mg)	CONTENU CAECAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm mg)	CONTENU COLIQUE radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm mg)	
PRELEVEMENTS à 45 minutes	LIBRE	96.926 86.541	3.082 11.836	1.530 4.250	591 4.076	451 2.505	207 1.533
	ESTERIF.	69 493	0	0	0	0	0
PRELEVEMENTS à 90 minutes	LIBRE	14.951 41.530	1.644 9.448	27.180 66.293	9.533 46.502	27.307 42.506	5.255 25.264
	ESTERIF.	11 132	0	7 163	0	0	0
PRELEVEMENTS à 180 minutes	LIBRE	6.342 24.023	1.533 10.720	13.428 41.962	21.109 42.296	22.530 40.812	23.117 32.097
	ESTERIF.	12 132	0	12 212	5 139	0	0

Tableau 4 bis - Métabolisme intestinal de 80 mg de cholestérol tritié (5 μ Cl)
chez le lapin privé de sécrétion pancréatique exocrine (N = 3)

Le cholestérol libre et estérifié sont séparés par chromatographie sur couche mince ; une partie est dosée colorimétriquement selon ZAK (88) l'autre partie est utilisée pour le comptage de radioactivité par scintillation liquide.

Les rendements sont déterminés après mesure du quenching par la technique des rapports de canaux (P 19).

2 - Résultats.

a) Sort du cholestérol libre (Tableau 4).

Chez le lapin normal, nous observons le déplacement de la vague cholestérolémique tritiée dont la disparition presque totale peut être observée 3 heures après l'administration.

Chez le lapin privé de sécrétion pancréatique, par contre, la radioactivité marque une stagnation prolongée dans le tube digestif.

Cette différence ne devient sensible qu'au bout de 90 minutes ; auparavant, la majeure partie de la radioactivité n'a pas quitté l'estomac. C'est au bout de trois heures que les différences sont les plus nettes, le taux de radioactivité restant à un niveau élevé et relativement constant à partir du jéjunum chez les lapins sans sécrétion pancréatique alors que ce taux est très bas à tous les niveaux chez les lapins normaux.

Nous observons pour les temps 90 et 180 mn des chutes de radioactivité dans le duodénum, tant en valeur absolue qu'en valeur spécifique. Pour les temps longs ce phénomène peut être interprété comme une dilution par le cholestérol froid endogène de la vague de cholestérol tritiée. Cette explication ne peut guère être invoquée pour les temps courts, aussi pensons nous que chez le lapin existe, d'une part, un transit assez bref dans le duodénum (qui est relativement court) ; d'autre part, lors du sacrifice de l'animal, du cholestérol provenant de la bile peut passer dans le duodénum isolé et venir diluer la radioactivité présente.

Une quantité sensible, mais assez limitée, de radioactivité a été retrouvée dans la fraction esters de stérols chez les lapins normaux alors

PRELEVEMENTS	à	ETAT DU CHOLE- TEROL	CONTENU GASTRIQUE	CONTENU DUODENAL	CONTENU JEJUNAL	CONTENU ILEAL	CONTENU CAECAL	CONTENU COLIQUE
			radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	radioact(dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)
PRELEVEMENTS	à	LIBRE	710 4.303	227 4.365	685 7.784	312 4.105	108 878	19 387
		ESTERIF.	54.954 72.787	4.346 44.347	727 34.619	87 2.718	94 1.044	0
PRELEVEMENTS	à	LIBRE	418 1.032	208 3.410	1.277 12.398	206 10.916	480 8.448	88 652
		ESTERIF.	60.162 54.346	18.835 22.019	11.807 67.856	4.957 40.631	8.448 21.943	132 795
PRELEVEMENTS	à	LIBRE	84 1.181	6.215 3.162	215 3.209	366 7.038	177 1.416	385 2.750
		ESTERIF.	4.373 9.718	6.424 17.362	9.284 24.441	6.415 15.273	5.244 41.592	2.676 18.20

Tableau 5 - Métabolisme intestinal de 133 mg d'oléate de cholestéryle (5 μ Ci) chez le lapin normal (N = 3).

PRELEVEMENTS	ETAT DU CHOLE- STEROL	CONTENU GASTRIQUE radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU DUODENAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU JEJUNAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU ILEAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU CAECAL radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)	CONTENU COLIQUE radioact (dpm) rad. Spéc. (dpm/mg)
à 45 minutes	LIBRE	366 6.421	4.043 19.252	208 2.237	33 388	48 331	12 235
	ESTERIF.	96.451 78.415	38.521 71.333	1.243 14.125	617 14.690	410 5.711	22 338
à 90 minutes	LIBRE	201 427	1.070 4.755	2.606 17.972	1.646 18.289	2.530 9.960	933 5.831
	ESTERIF.	29.778 52.242	24.311 39.193	12.969 56.386	3.250 28.261	5.663 34.321	9.928 22.530
à 180 minutes	LIBRE	2.282 6.812	1.483 13.731	1.703 13.624	2.366 18.928	2.117 11.761	3.382 20.497
	ESTERIF.	5.314 14.170	7.446 22.917	8.152 29.114	25.855 39.174	9.971 51.133	9.349 43.483

Tableau 5 bis - Métabolisme intestinal de 133 mg d'oléate de cholestéryle ($5 \mu\text{Ci}$)
chez le lapin privé de sécrétion pancréatique ($N = 3$).

que chez les lapins opérés cette radioactivité tend à s'ammenuiser dans la portion distale du tube digestif. Les radioactivités des esters sont cependant faibles devant celles de la fraction libre, mais comme les concentrations intraluminales de ces esters sont basses, les radioactivités spécifiques sont relativement élevées, surtout dans le contenu duodénal où elles peuvent dépasser celles du cholestérol libre.

b) Sort du cholestérol estérifié (Tableau 5).

La radioactivité portée par le cholestérol estérifié se maintient à un niveau élevé au bout de 3 heures, ceci étant plus marqué chez le lapin sans sécrétion pancréatique que chez le lapin normal. La dilution par le cholestérol estérifié endogène, il est vrai, doit demeurer très limitée.

La radioactivité qui apparaît en quantités importantes dans la fraction libre dans les deux lots de lapins témoigne de l'hydrolyse de l'ester administré. Cette hydrolyse semble débiter dès l'estomac puisqu'une radioactivité notable est mesurée sur le cholestérol libre, surtout pour les temps 45 minutes.

La radioactivité de la fraction libre est beaucoup plus importante chez les lapins sans sécrétion pancréatique. Comme la radioactivité des esters se maintient à un niveau plus élevé que chez les lapins normaux, cette augmentation de radioactivité du cholestérol libre doit être attribuée à la stagnation - précédemment constatée - du cholestérol tritié libéré.

3 - Discussion et conclusion.

Le cholestérol libre, dont la radioactivité disparaît assez rapidement du contenu intestinal, semble absorbé plus fortement que le cholestérol provenant de l'oléate de cholestéryle. Il est probable, d'après la description de ce processus par DAY (25) que le terme d'absorption désigne ici non pas un transfert vers le milieu intérieur du lapin, qui est tardif dans le cas du cholestérol, mais une captation par la muqueuse.

En l'absence de sécrétion pancréatique le contenu intestinal conserve davantage de radioactivité et peut présenter des activités encore importantes dans le caecum et le côlon, ce qui correspond à une captation diminuée.

Notre protocole ne nous permet pas d'avancer d'hypothèse pour le mécanisme d'action de la sécrétion pancréatique sur la captation du cholestérol libre par la muqueuse ; par contre l'hydrolyse déficiente des esters (objectivée par le taux élevé de radioactivité subsistant dans cette fraction) peut expliquer en partie la stagnation de la radioactivité administrée.

Les conditions régnant dans le tube digestif des lapins non opérés semblent peu propices à l'estérification du cholestérol libre. Seul le duodénum montre une légère estérification qu'on ne retrouve pas chez les lapins opérés. La radioactivité des esters dans le jéjunum et l'iléon qui suivent peut être dûe soit à une estérification à ces niveaux, soit au transit d'esters synthétisés dans le duodénum. Seul, un protocole éliminant les interactions entre les différents étages du grêle peut permettre de trancher.

L'hydrolyse des esters de cholestéryle est intense ; chez les lapins témoins on retrouve du cholestérol libre provenant des esters tout au long de l'intestin. Comme ce cholestérol libre semble disparaître très rapidement de la lumière intestinale, il est plausible que la présence de cholestérol libre corresponde à une activité hydrolytique dans le contenu prélevé.

Il existe apparemment deux activités - gastrique et duodénale - qui subsistent dans une large mesure en l'absence de sécrétion pancréatique. La présence d'activités cholestérol estérasiques en amont du canal de Wirsung pose un problème nouveau dans la mesure où on attribuait aux activités de ce type une origine exclusivement pancréatique (HERNANDEZ 42). Ce problème demande à être approfondi par des études "in vitro".

II - ETUDE DU SORT DU CHOLESTEROL LIBRE OU ESTERIFIE DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE.

1 - Protocole expérimental.

a) Principe.

Nous administrons à des lapins intacts ou dont le canal de Wirsung a été ligaturé une émulsion renfermant du cholestérol libre marqué au

carbone 14 sur le carbone 4 et de l'oléate de cholestéryle marqué au tritium (marquage général) sur le noyau stérol.

Le double marquage permet de suivre de façon précise les échanges entre les fractions libres et estérifiées ; en effet, si dans le contenu intestinal les échanges se font presque uniquement dans le sens libre $\rightarrow$ estérifié, dans la muqueuse intestinale à ce processus se surajoute une estérification. D'autre part ce procédé réduit de moitié le nombre des sujets à utiliser par rapport à la technique de simple marquage, et, surtout, il réduit l'influence des variations individuelles puisque le même sujet reçoit à la fois les deux formes de cholestérol.

b) Préparation de l'émulsion.

Nous avons procédé comme dans l'expérimentation précédente mais en utilisant 2,5 microcuries de cholestérol ($4 - {}^{14}\text{C}$) avec 40 mg de cholestérol non marqué et 2,5 microcuries d'oléate de cholestéryle (${}^3\text{H}$)_G avec 69 mg d'oléate de cholestéryle non marqué.

c) Administration et prélèvements.

Comme dans le chapitre précédent, la muqueuse prélevée a été traitée selon le mode décrit dans la partie technique (p 6). Le contenu intestinal correspondant à chaque partie du grêle prélevée a également été traité afin de vérifier l'absence de contamination de la muqueuse par du contenu intestinal.

d) Dosages sur les muqueuses.

Les lipides sont extraits par la technique de DELSAL après broyage dans le solvant en présence d'environ 5 g de sulfate de sodium anhydre.

Le cholestérol est dosé selon la méthode de ZAK (88).

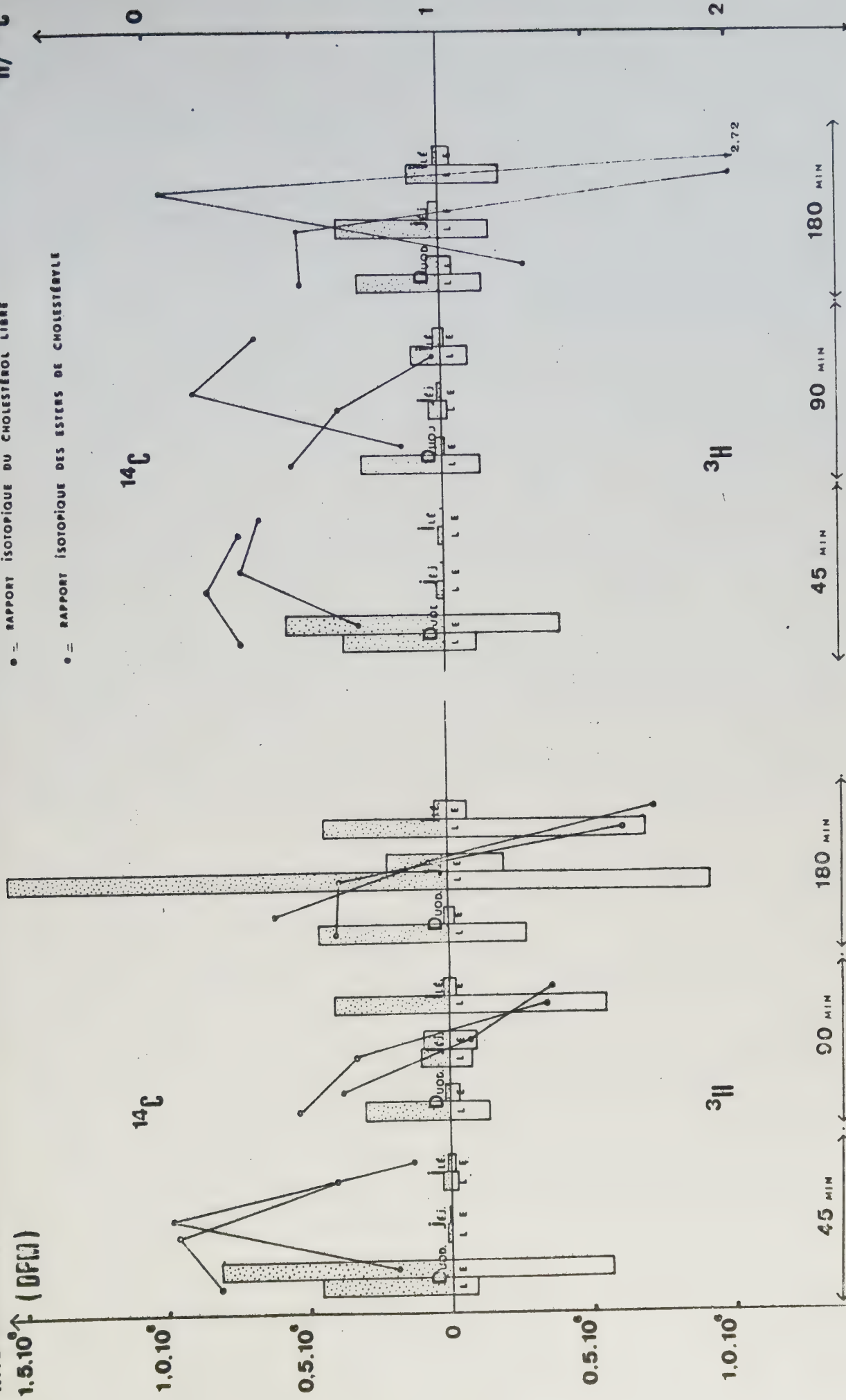
Les rendements de comptage du ${}^3\text{H}$ et du ${}^{14}\text{C}$ sont déterminés par la méthode de standardisation externe (63).

RADIOACTIVITÉ
 $1.5 \cdot 10^5 \uparrow$ (DPM)

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$

• = RAPPORT ISOTOPIQUE DU CHOLESTÉROL LIBRE

• = RAPPORT ISOTOPIQUE DES ESTERS DE CHOLESTÉRYLE



LAPINS NON OPÉRÉS

LAPINS PRIVÉS DE SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE

FIGG: CAPTATION PAR LA MUQUEUSE INTESTINALE DU CHOLESTÉROL ($^3\text{H}_G$) ET DE L'OLÉATE DE CHOLESTÉRYLE ($4\text{-}^{14}\text{C}$) DANS LES FRACTIONS LIBRES ET ESTÉRIFIÉES.

2 - Résultats (Figure 6).

Captation du cholestérol libre par la muqueuse : chez le lapin normal cette captation est sensible dès 45 mn dans le duodénum où une part importante est estérifiée. Curieusement, la radioactivité apparaît plus rapidement dans l'iléon que dans le jéjunum ; néanmoins c'est dans ce dernier que l'on retrouve la plus grande part de la radioactivité du carbone 14 au bout de trois heures.

Chez les lapins sans sécrétion pancréatique, alors que la pénétration du carbone 14 dans les muqueuses jéjunale et iléale est fortement réduite (réduction au $\frac{1}{4}$ environ), la captation duodénale est beaucoup moins affectée par l'opération : on observe certes une légère baisse d'incorporation du cholestérol libre, mais dans des proportions qui n'ont rien de comparable avec ce que l'on voit au-delà du canal de Wirsung.

Captation du cholestérol des esters par la muqueuse : pour le prélèvement 45 minutes apparaît une importante incorporation de tritium dans le duodénum localisée surtout dans les esters. La radioactivité apparaît plus rapidement dans l'iléon que dans le jéjunum, mais le maximum de radioactivité du tritium se retrouve dans le jéjunum dans la fraction libre.

Chez les lapins sans sécrétion pancréatique, l'incorporation du tritium par le duodénum reste importante, surtout à 45 minutes sous forme estérifiée ; par contre elle est très diminuée et reste inférieure à celle du cholestérol libre dans la partie distale du grêle.

Degré d'estérification dans la muqueuse : le duodénum estérifie de façon importante le cholestérol libre pour les temps courts (45 mn), de plus le cholestérol tritié est présent surtout sous forme estérifiée le rapport ^{14}C libre / ^{14}C estérifié est de 0,56 alors que celui ^3H libre / ^3H estérifié est de 0,13 ce qui pourrait indiquer un passage direct du cholestérol estérifié dans la muqueuse sans hydrolyse préalable.

Ce résultat ne semble pas dû à une contamination par le contenu intestinal : une contamination par le tritium devrait s'accompagner d'une autre contamination par le ^{14}C , les deux isotopes étant présents en quantités sensiblement égales dans le contenu duodénal. En fait on constate

une disproportion importante entre les deux isotopes ; d'autre part cette distribution des radioactivités se retrouve, de façon très semblable, chez les lapins sans sécrétion pancréatique.

Par la suite, le pourcentage d'incorporation de la radiocativité administrée diminue, ceci dans les deux lots de lapins.

. La muqueuse jéjunale estérifiee fortement le cholestérol lorsqu'il apparaît en quantités notables (90 minutes) ; par la suite, le pourcentage de cholestérol estérifié diminue, le cholestérol estérifié provenant de l'oléate étant proportionnellement plus abondant dans les esters que le cholestérol marqué au carbone 14.

Chez les lapins privés de sécrétion pancréatique l'estérification est diminuée, de pair avec la captation ; en particulier on ne retrouve pratiquement plus de tritium dans les esters.

. La muqueuse iléale présente une affinité importante pour le cholestérol dans la mesure où il est sous forme libre. Le pourcentage des esters y est assez faible sauf, comme pour les autres parties du grêle, au moment de l'arrivée du cholestérol.

La radioactivité des esters montre chez les lapins normaux une légère prédominance du tritium (rapport isotopique de 1,7) qui peut s'expliquer par l'abondance du tritium dans la fraction libre.

Chez les lapins privés de sécrétion pancréatique la quantité de cholestérol estérifié reste faible et le rapport isotopique inférieur à l'unité pour les temps 45 et 90 mn ; il n'est en faveur du tritium que pour les temps de 180 mn où sa valeur est voisine de celle du cholestérol libre (2,94 pour le cholestérol libre et 2,71 pour le cholestérol estérifié).

3 - Discussion et conclusion.

Le cholestérol peut être incorporé, à des degrés divers, par la muqueuse intestinale à tous les niveaux du grêle.

. La captation duodénale intervient pour une part relativement importante (15 à 20 p 100 du total) et semble peu dépendante de la présence de

la sécrétion pancréatique.

L'important pourcentage du cholestérol - 4 - ^{14}C que l'on retrouve dans les esters de cholestéryle indique une forte activité cholestérol-estérifiante. Cependant la différence entre les rapports isotopiques des fractions libres et estérifiées oblige à attribuer une origine différente de celle des esters marqués au ^{14}C à une grande partie des esters tritiés.

Deux hypothèses peuvent être avancées :

- le cholestérol tritié libéré par hydrolyse intraluminale des esters est préférentiellement réestérifié (peut-être grâce à l'apport d'acides gras qu'entraîne son hydrolyse).

- une absorption directe d'esters par la muqueuse semble possible, phénomène qui n'a jusqu'alors été observé qu'in vitro (SMITH & Coll 72).

• La captation jéjuno-iléale demeure la plus importante lorsque l'intégrité de la sécrétion pancréatique est respectée.

Le maximum se situe dans le jéjunum, ce qui concorde avec les résultats de SWELL & Coll (73) chez le rat et de FELDMAN & Coll (30) chez le hamster ; néanmoins cette captation reste forte dans l'iléon. Le cholestérol provenant des esters prédomine dans l'iléon sur celui d'origine libre ; il est permis de penser que le pic de captation maximale du cholestérol des esters est décalé en position aborale par rapport à celui du cholestérol libre (jéjunum). On peut attribuer ce décalage au processus d'hydrolyse - qui semble un préalable nécessaire à ce niveau - et qui apporte un certain retard par rapport au cholestérol libre immédiatement disponible.

Du fait de l'absorption plus facile du cholestérol libre (carbone 14), le contenu intestinal tend à s'enrichir en cholestérol tritié, et, de ce fait, le rapport isotopique ($^3\text{H} / ^{14}\text{C}$) du cholestérol incorporé par la muqueuse augmente en fonction de la distance parcourue dans l'intestin.

On peut noter dans l'augmentation de ce rapport une inflexion au niveau du jéjunum, tout particulièrement chez les lapins opérés. Ceci est sans doute dû à une diminution de l'activité hydrolytique dans le jéjunum, ne fournissant ainsi plus de cholestérol tritié à la fraction libre.

A tous les niveaux du grêle nous avons observé une forte estérification du cholestérol lorsque son absorption débute ; le pourcentage des esters diminue par la suite lorsque les quantités de cholestérol en présence deviennent importantes (jéjunum et iléon surtout). On peut estimer que la vitesse d'estérification dans ces muqueuses est assez lente alors que le cholestérol libre s'accumule rapidement. Si l'on s'accorde à considérer avec MURTHY & Coll (61) que le passage du cholestérol de la muqueuse vers la lymphe implique une estérification, l'apparente lenteur de ce processus pourrait rendre compte du décalage qui existe entre la disparition du cholestérol de la lumière intestinale (3 heures environ) et son maximum dans la lymphe (6 à 9 heures).

Nos résultats indiquent que le pourcentage d'esters dans la muqueuse est loin d'être négligeable chez les lapins sans sécrétion pancréatique. Ce fait impliquerait que, contrairement à ce qui a été décrit chez le rat par HERNANDEZ & Coll (42), subsiste une certaine activité cholestérol estérifiante dans la muqueuse en l'absence de sécrétion pancréatique. Ceci a été retrouvé chez le rat par BORJA (16) qui a montré que la disparition de cette activité ne survenait qu'après suppression simultanée des sécrétions pancréatique et biliaire.

La baisse d'incorporation du cholestérol par la muqueuse à la suite de la privation de sécrétion pancréatique ne semble donc pas uniquement due à un affaiblissement de l'activité cholestérol estérifiante de la muqueuse mais plutôt à une déficience dans le processus de pénétration dans cette dernière. La captation duodénale procède sans doute d'un mécanisme différent puisque l'absence de sécrétion pancréatique ne l'affecte que faiblement.

C H A P I T R E I V

ETUDE IN VITRO DE L'INFLUENCE DE LA SECRETION PANCREATIQUE SUR LES ACTIVITES CHOLESTEROL ESTERASIQUES DANS LE CONTENU INTESTINAL

I - ETUDE "IN VITRO" DE L'ACTIVITE CHOLESTEROL ESTERASIQUE DU SUC PANCREATIQUE.

1 - Généralités.

La stabilité des émulsions renfermant les substrats représente le principal problème dans ce genre d'étude. Comme les substrats - cholestérol, acides gras ou esters de cholestéryle - sont pratiquement insolubles dans l'eau, la réaction a probablement lieu en milieu biphasique ; l'accessibilité du substrat à l'enzyme hydrosoluble est donc capitale dans la vitesse de réaction.

Les acides gras utilisés pour l'estérification n'ont pas besoin d'être activés sous forme d'acyl - Co A : la présence d'ATP, de Co A - SH ou de tout autre cofacteur ne modifie ni le degré ni la vitesse d'estérification du cholestérol (TREADWELL 76).

De nombreux auteurs ont utilisé des suspensions colloïdales de cholestérol et d'acide gras (HERNANDEZ 41) ou des émulsions stabilisées par des protéines ou des agents tensioactifs. Plus récemment MURTHY & GANGULY (60) ont utilisé une dispersion éthanolique des substrats.

Nous nous sommes inspirés des conditions proposées par SHAH & Coll (68) pour la fabrication de milieux d'incubation en vue de l'étude de l'estérification : ceux-ci comportent une émulsification par le taurocholate de sodium des substrats dissouts dans de faibles quantités d'acétone.

Les esters de cholestéryle des acides gras saturés sont par contre très peu solubles dans l'acétone ; aussi avons-nous modifié le milieu en dissolvant les substrats dans l'éther éthylique.

Ces milieux artificiels ne prétendent pas reproduire les conditions régnant "in vivo", mais permettent d'étudier les activités enzymatiques sous l'influence d'un nombre limité de facteurs.

2 - Protocole expérimental.

a) Milieu d'incubation pour l'étude de l'activité estérifiante.

Pour 10 incubations (40 ml) :

- Prendre 1 μCi de cholestérol (^3H)G, évaporer le toluène. Ajouter 50 μmoles de cholestérol (19,3 mg) et dissoudre le tout dans 2 ml d'acétone.
- Ajouter 50 μmoles d'acide gras dans 2 ml d'acétone.
- Emulsionner avec 100 mg de taurocholate de sodium dissout dans 1 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 6,2.
- Rajouter 36 ml de tampon, homogénéiser 2 heures au bain-marie à 37°C à agitation.

b) Milieu d'incubation pour l'étude de l'activité hydrolytique.

- Dissoudre dans 4 ml d'éther éthylique 50 μmoles d'ester de cholestéryle.

Soit :

22,8 mg de butyrate de cholestéryle		
31,3 mg de palmitate "	"	"
32,7 mg de stéarate "	"	"
32,6 mg d'oléate "	"	"
32,5 mg de linoléate "	"	"

- Ajouter 100 mg de taurocholate de sodium dissouts dans 1 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,2.
- Ajouter 35 ml de tampon phosphate. Homogénéiser à l'ultraturax 3 fois 10 secondes, puis deux heures au bain-marie à 37°C à agitation constante.

c) Conditions d'incubation.

Le suc pancréatique a été recueilli selon la méthode indiquée p 7.

4 ml de substrat sont incubés à agitation à 37°C en présence de 0,2 ml de suc pancréatique soit 0,8 mg de protéine (mesuré par la technique de LOWRY (54)).

		t ₀ radioactivité (dpm)	3h (dpm)	3h corrigé (dpm)	dpm t ₀ /3h	μmoles estérifiées	% estérification
* dipalmitoyl lécithine	L	96.999	92.249	92.249	97.206	0,003	0,07
	E	207	280	73	92.529		
Acide palmitique	L	94.481	90.635	90.635	94.751	0,314	6,28
	E	270	6.370	6.100	97.005		
Acide stearique	L	104.144	86.793	86.793	104.412	0,606	12,11
	E	268	12.235	11.967	92.750		
Acide oléique	L	94.686	21.300	21.300	95.001	3,834	76,68
	E	315	70.782	70.067	91.367		
Acide linoléique	L	95.771	25.977	25.977	96.064	3,560	71,20
	E	293	64.536	64.234	90.220		

* Dissolution dans le méthanol au lieu de l'acétone.

Tableau 6 - Activité cholestérol estérasiqque du suc pancréatique du lapin :
Estérification du cholestérol tritié en présence de différents substrats.

		to poids cholest. (Y)	3h (Y)	3h corrigé (Y)	cholest. total t _o /3h(Y)	μmoles hydrolysées	% hydrolyse
butyrate de cholestér.	L	21	1789	1767	1745	4,804	96,08
	E	1724	72	72	1839		
palmitate de cholestér.	L	23	342	319	1825	0,872	17,45
	E	1802	1509	1509	1828		
stéarate de cholestér.	L	23	660	660	1777	1,900	38,01
	E	1754	1076	1076	1736		
oléate de cholestér.	L	30	1748	1718	1780	4,847	96,95
	E	1750	54	54	1772		
linoléate de cholestér.	L	39	1844	1805	1731	4,569	91,39
	E	1692	170	170	1975		

Tableau 6 bis - Activité cholestérol estérasique du suc pancréatique du lapin :
Hydrolyse de divers esters de cholestéryle.

Une étude cinétique sur l'estérification de l'acide oléique et sur l'hydrolyse de son ester nous ont montré que l'équilibre était atteint au bout de 3 heures environ. Pour les substrats saturés l'équilibre est plus lent à atteindre (6 heures environ). Dans le but d'obtenir des informations transposables in vivo, nous avons pris comme temps d'incubation trois heures : des temps supérieurs n'ayant sans doute guère de signification physiologique de toute façon en raison des modifications de paramètres qu'apporte le transit in vivo.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de 30 ml d'alcool-acétone (1:1, v/v).

3 - Résultats (Tableau 6).

a) Estérification.

La cholestérol estérase du suc pancréatique du lapin synthétique avec des rendements élevés des esters de cholestéryle d'acides gras insaturés (18:1 et 18:2). Les esters d'acides gras saturés sont moins bien estérifiés, l'acide stéarique l'étant cependant 2 fois plus que l'acide palmitique.

L'estérification en présence de dipalmitoyl lécithine est pratiquement nulle ; nous avons obtenu dans les mêmes conditions (dissolution des substrats dans le méthanol) un pourcentage d'estérification du cholestérol de 24,7 % avec l'acide palmitique, ce qui prouve que l'enzyme était active dans les conditions utilisées.

b) Hydrolyse.

Nous obtenons des hydrolyses très fortes avec l'oléate, le linoléate et le butyrate de cholestéryle alors que les esters saturés sont beaucoup moins fortement clivés. Nous retrouvons la même différence que lors de l'épreuve d'estérification entre le stéarate et le palmitate : l'hydrolyse du stéarate est environ deux fois plus forte que celle du palmitate de cholestéryle.

4 - Discussions et conclusions.

Si nous comparons nos résultats à ceux obtenus par SHAH & LOSSOW (68)

chez le rat, nous obtenons dans des conditions strictement identiques 76,7 % d'estérification avec l'acide oléique pour 0,8 mg de protéines environ alors que ces auteurs obtiennent chez le rat 67,7 % d'estérification pour 1,6 à 1,8 mg de protéines. C'est-à-dire que l'activité intrinsèque du suc pancréatique du lapin semble deux fois plus forte que celle mesurée chez le rat.

Le suc pancréatique du lapin présente dans de très fortes activités estérifiantes et hydrolytiques vis-à-vis des substrats insaturés.

Pour l'estérification, l'ordre des spécificités vis-à-vis des acides gras est semblable à celui trouvé chez le rat par SHAH & LOSSOW (68) et MURTHY & GANGULY (60). Par contre, l'estérification du cholestérol chez le lapin est plus faible par les acides insaturés. L'estérification par le stéarate est deux fois plus intense que par le palmitate. Ce dernier fait révèle que les critères de solubilité ne sont certainement pas les seuls à intervenir (de ce point de vue la différence est faible entre $C_{16} : 0$ et $C_{18} : 0$). Il existe aussi une spécificité vis-à-vis de la longueur de la chaîne carbonée. Lorsque l'acide palmitique est présenté sous forme de lécithine, l'estérification pancréatique est nulle, ce qui signifie qu'elle procède d'un mécanisme différent de celui du plasma renfermant une β - lécithine - cholestérol - acyltransférase.

L'hydrolyse des esters de cholestéryle donne des résultats très différents selon les milieux utilisés. SWELL & TREADWELL (74) utilisant une dispersion à l'aide d'albumine et de sels biliaires, n'ont observé de fortes activités que vis-à-vis des esters d'acides courts (acétate, butyrate et caproate) avec pour l'oléate 6 % de l'activité observée sur le butyrate. VAHOUNY & WEERSING (78) par contre, avec une dispersion de phospholipides et sels biliaires, ont montré une absence quasi-totale de spécificité de l'enzyme vis-à-vis de l'acide estérifié.

Nos résultats sont intermédiaires, Si nous trouvons de très fortes hydrolyses du butyrate, de l'oléate et du linoléate, nous n'en trouvons pas moins une différence avec les esters saturés. Chez ces derniers se retrouve la différence déjà observée pour l'estérification dans les cinétiques d'hydrolyse (38,0 p 100 pour le stéarate et 17,4 p 100 pour le palmitate).

Nous voyons donc que la cholestérol estérase pancréatique chez le lapin possède une très forte activité. Selon les conditions employées (pH, émulsion...) l'estérification ou l'hydrolyse l'emportent, dans tous les cas les réactions sur les substrats insaturés sont les plus complètes et les plus rapides. Il reste évidemment à déterminer laquelle des deux activités l'emporte dans les conditions qui règnent dans l'intestin et quelle est son importance.

II - ETUDE "IN VITRO" DE L'INFLUENCE DE LA SECRETION PANCREATIQUE SUR LES ACTIVITES CHOLESTEROL ESTERASIQUES DE CONTENUS DIGESTIFS.

1 - Généralités.

Ce genre d'étude, à notre connaissance, a été peu pratiquée ; ce n'est que récemment que des travaux sur l'estérification du cholestérol par des homogénats de fèces ont été publiés (ROSENFELS & HELLMAN 67). Pour la préparation de nos milieux d'incubation nous nous sommes inspirés de la technique proposée par ces auteurs. Nous avons cependant apporté quelques modifications : les contenus intestinaux sont dilués au quart de façon à obtenir une bonne homogénéité et nos temps d'incubation sont beaucoup plus courts (2 heures maximum), en effet les résultats obtenus avec des durées d'incubation plus longues ne semblent guère transposables "in vivo".

2 - Protocole expérimental.

a) Nous étudierons l'activité estérifiante et hydrolytique d'homogénats de contenus digestifs à tous les niveaux du tube digestif provenant :

- de lapins non opérés témoins (3)
- de lapins privés de sécrétion pancréatique (3)
- de lapins privés de sécrétion pancréatique (3) dans les homogénats desquels du suc pancréatique est rajouté.

Ces animaux sont mis à jeun 24 heures ; trois heures avant le sacrifice ils reçoivent 40 grammes de granulés.

b) Milieu d'incubation.

- estérification (pour 20 incubations).

2 μ Ci de cholestérol (^3H)G, dans le toluène qu'on évapore et le cholestérol est repris par 2 ml d'une solution à 0,5 p 100 de TWEEN 80 dans l'éthanol 95°.

L'éthanol est évaporé sous azote et on ajoute 50 ml de chlorure de sodium en solution aqueuse à 9°/100 en deux temps : d'abord 5 ml et mise en agitation une heure au bain-marie à 37°C, puis rajouter les 45 ml restants et remettre au bain-marie une heure.

. hydrolyse : on procède de même en employant 2 μ Ci d'oléate de cholestéryle (cholestérol tritié).

- Préparation des homogénats de contenus digestifs.

Les contenus de l'estomac, du duodénum, du jéjunum, de l'iléon, du caecum et du colon sont prélevés séparément dès le sacrifice de l'animal.

Ces contenus sont dilués au 1/4 avec du sérum physiologique et homogénéisés 10 secondes à l'ultraturax (20 000 t/mn).

Dans le troisième lot la quantité de suc pancréatique rajoutée est de 50 μ l renfermant environ 0,2 mg de protéines.

- Incubations.

Prendre 2,5 ml de milieu d'incubation (soit environ 10^5 cpm).

Ajouter 2 ml d'homogénat de contenu digestif dilué au quart. Placer au bain-marie à agitation à 37°C.

Les prélèvements sont effectués à 0,30, 60 et 120 minutes.

Les lipides sont extraits par l'alcool-acétone et le cholestérol libre et estérifié séparés par chromatographie sur couche mince avant le comptage de radioactivité par scintillation liquide.

% D'HYDROLYSE

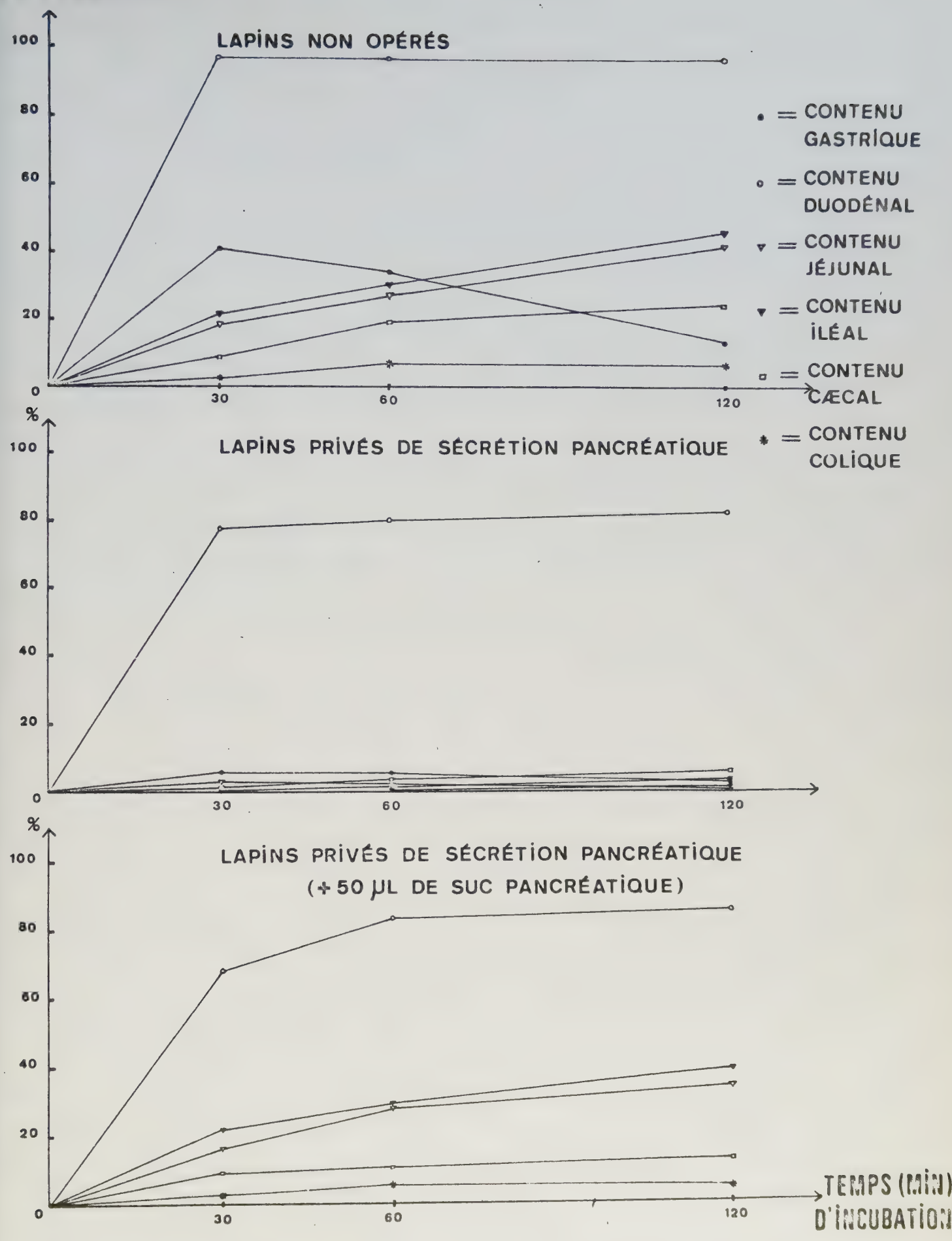


FIG 7 : POURCENTAGES D'HYDROLYSE DE L'OLÉATE DE CHOLESTÉRYLE TRITIÉ EN PRÉSENCE D'HOMOGÉNATS DE CONTENUS DIGESTIFS

3 - Résultats.

a) Activités estérifiantes.

Ces activités sont pratiquement nulles à tous les niveaux du tube digestif et quelque soit le traitement subi par les lapins, aussi ne présentons nous pas de figure.

La seule activité notable (4,5 à 6,5 p 100) a été enregistrée dans le duodénum des lapins privés de sécrétion pancréatique ; l'apport de suc pancréatique ne modifie pratiquement pas ce degré d'estérification.

En ce qui concerne les contenus des autres étages du tube digestif nous n'avons pas mis en évidence d'estérifications supérieures à 2 p 100, ces dernières n'étant atteintes que dans les contenus de lapins privés de sécrétion pancréatique auxquels on rajoute du suc pancréatique.

b) Activités hydrolytiques (Figure 7).

Chez les lapins normaux nous voyons :

- dans le contenu gastrique, une activité notable mais très particulière : après un maximum rapidement atteint vers 41 p 100 il semblerait que le cholestérol libéré soit réestérifié puisqu'au bout de 2 heures le pourcentage total d'hydrolyse n'est plus que de 13 p 100.

- dans le contenu duodénal, une activité intense caractérisée par une hydrolyse extrêmement rapide et presque totale de l'oléate de cholestéryle.

- dans le contenu jéjunal et iléal, des activités relativement fortes et très voisines (42 et 46 p 100 au bout de 2 heures).

- dans le caecum une activité un peu plus faible, mais dont la cinétique présente la même allure que celle du jéjunum et de l'iléon ; dans le côlon existe une légère hydrolyse qui est de 6 p 100 au bout de 2 heures.

Chez les lapins privés de sécrétion pancréatique.

- une disparition pratiquement complète de toutes les activités hydroly-

tiques (y compris celle du contenu gastrique) à l'exception du contenu duodénal où l'hydrolyse, bien que légèrement atténuée (80 p 100 au lieu de 96 p 100) reste très intense.

Lorsqu'on rajoute 50 μ l de suc pancréatique à ces contenus digestifs on assiste à une restauration des activités hydrolytiques à tous les niveaux. Ces activités sont légèrement inférieures à celles constatées chez les lapins normaux, ce qui peut être dû à une insuffisance de la quantité de suc rajoutée, quantité difficile à estimer et qui est ici très réduite.

4 - Discussions et conclusions.

Il existe donc des activités hydrolytiques vis-à-vis des esters de cholestéryle tout au long du tube digestif du lapin.

Ces activités peuvent être rangées en deux groupes :

- ne dépendant pas de la présence de la sécrétion pancréatique : il s'agit de l'activité du contenu duodénal dont il faut noter l'extrême rapidité d'action d'une part, et d'autre part le degré d'hydrolyse atteint qui est proche de 100 p 100.

- dépendant de la présence de la sécrétion pancréatique : il s'agit de toutes les autres activités (intestin grêle à partir du canal de Wirsung jusqu'au côlon et estomac). En se basant sur l'allure des cinétiques d'hydrolyse, on peut penser qu'il s'agit d'un même type d'activité à partir du jéjunum jusqu'au côlon, avec un net affaiblissement dans le caecum et le côlon.

Une cholestérol-ester hydrolase semble donc sécrétée dans le duodénum ; il est douteux qu'elle soit d'origine gastrique car l'activité hydrolytique peut subsister dans le duodénum alors qu'elle disparaît de l'estomac. Cette activité, intense dans le duodénum, ne s'exprime pas dans le jéjunum et au-delà, du moins chez les lapins privés de sécrétion pancréatique. Ce fait tend à indiquer que, seules, les conditions régnant dans le contenu duodénal lui sont favorables (pH relativement bas, sels biliaires abondants, lipides encore peu hydrolysés).

Il est d'autre part probable que chez les sujets normaux, l'action de cette enzyme soit assez fugace du fait de la brièveté du duodénum et de la rapidité du transit dans cette région à motricité intense. Les activités hydrolytiques présentes du côté aboral par rapport au canal de Wirsung, bien que plus faibles, s'exercent de façon prolongée sur les matières ingérées, ce qui leur confère sans doute un rôle primordial.

Ces activités sont probablement dûes à la cholestérol estérase du suc pancréatique ; cependant rien ne nous permet d'écarter l'hypothèse d'une enzyme d'origine intestinale qui requerrait une activation préalable par le suc pancréatique. L'addition d'une quantité égale de suc pancréatique aux différents homogénats provenant de lapins sans sécrétion pancréatique ne conduit pas à des hydrolyses égales, mais à des hydrolyses dont les degrés s'échelonnent comme chez les lapins normaux. Cette répartition laisse supposer que la diminution de l'activité hydrolytique observée dans le caecum et le côlon n'est pas tant due à une inactivation de l'enzyme qu'à une variation du milieu qui offrirait alors des conditions moins favorables à l'activité hydrolytique. Il n'est donc pas exclu que subsiste jusque dans les crottes susceptibles d'être réingérées par coprophagie une activité cholestérol estérasique latente.

DISCUSSION GENERALE

A - Rôle de la sécrétion pancréatique et apport de cholestérol à l'organisme.

L'absence de sécrétion pancréatique ne s'accompagne pas d'une baisse importante de la cholestérolémie. Par contre nous avons mis en évidence une élévation transitoire, mais importante du rapport CL/CE pendant les quatre premières semaines après l'opération. Cette prépondérance du cholestérol libre est sans doute dûe à la synthèse endogène ; le cholestérol d'origine exogène, fourni à l'organisme surtout sous forme estérifiée, (ZILVERSMIT 86) ne suffisent plus à couvrir les besoins de l'organisme.

Le retour à la normale du rapport CL/CE (environ 0,5) peut être attribué à l'équilibre existant entre la cholestérol estérase plasmatique (WELLS & RONGONE 81) et la cholestérol ester hydrolase hépatique (SHOPE 70).

L'utilisation de régime hypercholestérolé a permis d'estimer la part qui revient à la sécrétion pancréatique dans l'apport à l'organisme de cholestérol d'origine exogène. La signification physiologique d'un tel régime peut être discutée, certains auteurs estimant trop éloignées des conditions normales un taux de 1 p 100 de cholestérol dans la ration ; il n'en reste pas moins qu'une bonne partie de nos connaissances sur l'athérome a été obtenue grâce à de telles expérimentations (WOLFF & BRIGNON 84).

Si la ligature du canal de Wirsung protège efficacement le lapin de l'hypercholestérolémie (et de l'hyperlipémie), cette protection n'est pas totale. L'augmentation des cholestérolémies, encore sensible en raison des importantes quantités de cholestérol administrées, est réduite à environ 1/6ème de la normale. Nos expériences ultérieures de captation par la muqueuse de cholestérol radioactif nous permettent de mettre en cause l'absorption duodénale qui semble beaucoup moins affectée par cette privation que l'absorption jéjunoléale si l'on en juge par le taux de captation des doses traceuses.

Ce type d'expérience n'a pas été pratiqué chez d'autres mammifères à notre connaissance. Seules ont été réalisées des administrations de doses traceuses uniques. BELL & SWELL (9) ont montré ainsi une absence quasi totale d'absorption du cholestérol radioactif administré par os. Il faut noter d'ailleurs que la comparaison entre lapins privés de sécrétion

pancréatique et les autres mammifères dans le même état est beaucoup plus pertinente que la comparaison entre lapins et les autres mammifères normaux, en raison de la différence de disposition du canal de Wirsung.

B - Rôle de la sécrétion pancréatique dans la captation intestinale du cholestérol libre ou estérifié.

Les résultats obtenus sur l'incorporation du cholestérol marqué libre ou estérifié par la muqueuse intestinale indiquent que l'absorption du cholestérol chez le lapin est principalement jéjunale et non iléale comme l'avaient proposé BUCHWALD & GEBHARD (17) par la technique beaucoup plus traumatisante d'intestinal bypass.

Les différentes propriétés (hydrolyse intraluminale, captation, estérification intramurale) semblent - à quelques degrés près - de nature assez voisine tout au long du grêle chez le lapin normal. La suppression de la sécrétion pancréatique permet de dissocier le grêle en deux parties : le jéjuno-iléon étroitement dépendant de la sécrétion pancréatique et le duodénum par contre indépendant de cette sécrétion. Cette captation duodénale contredit la conception classique qui admet que les deux sécrétions biliaire et pancréatique - sont indispensables à une absorption normale du cholestérol (SCHUTZ 71).

Quelques hypothèses peuvent être avancées :

- une perméabilité particulière au cholestérol dans le duodénum par rapport aux étages inférieurs du grêle.

- une émulsification suffisante pour produire une captation duodénale notable ; cette émulsion se désorganiserait rapidement ou serait insuffisante pour permettre une absorption jéjunale et iléale correcte.

Les acides biliaires seraient évidemment impliqués dans ce deuxième processus, mais peut-être aussi des produits de l'hydrolyse gastrique de triglycérides qui a été décrite chez le rat par HERTING (45) et chez l'homme (BANK) (6). Chez le lapin, d'autre part, du fait de la coprophagie, le contenu gastrique peut renfermer une certaine quantité de lipides polai-

res d'origine fécale bactérienne qui pourraient participer à la formation de micelles.

Il est intéressant de comparer le site de captation maximale du cholestérol et le site d'absorption des autres lipides. Alors que chez les mammifères à disposition cholédoque et canal de Wirsung proche du pyllore les sites d'absorption des graisses neutres (duodéal surtout d'après BORGSTROM & BENETT) et du cholestérol (jéjunal et iléal proximal) sont dissociés, il n'en va pas de même chez le lapin pour lequel on sait que ces deux sites sont au niveau jéjunal depuis Cl. BERNARD.

Ce décalage peut avoir une certaine importance. Le cholestérol, rappelons-le, doit être inclus dans des édifices multimoléculaires complexes (micelles) pour pouvoir être absorbé correctement. Dans la composition de ces micelles entrent non seulement des acides biliaires mais aussi des acides gras, des monoglycérides et sans doute aussi des lysolécithines (JOHNSTON) (47). Si une grande partie de ces composés vient à disparaître du contenu intestinal avant que le cholestérol n'arrive au niveau de son principal site d'absorption les micelles seront plus ou moins désorganisées et le cholestérol, moins bien émulsionné, ne sera absorbé qu'avec un rendement médiocre. Par contre, si l'absorption des composants micellaires se fait dans la même région que celle du cholestérol, on peut s'attendre à ce que le cholestérol finement émulsionné soit absorbé avec un rendement élevé ; c'est cette situation que l'on retrouve chez le lapin.

C'est ainsi que la disposition anatomique exceptionnelle du canal de Wirsung chez le lapin, jointes aux possibilités particulières d'absorption du duodénum, pourrait rendre compte des facilités d'absorption du cholestérol et de son aptitude à l'hypercholestérolémie. La moindre absorbalité du cholestérol, des esters peut trouver là son explication : libéré avec un certain retard, ce cholestérol serait soumis à l'absorption surtout dans la seconde moitié du grêle et dans des conditions moins favorables.

Le duodénum montre à d'autres égards un comportement particulier : le rapport isotopique ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$) des esters nettement supérieur à celui du cholestérol libre suggère une captation directe de l'oléate de cholestéryle par la muqueuse duodénale. Nos résultats sont en désaccord avec les données obtenues chez le rat par VAHOUNY & TREADWELL (76) et GOODMAN & SHIRATORI (38)

selon lesquels les esters doivent être hydrolysés pour qu'intervienne l'absorption du cholestérol. Ce principe de non absorbabilité du cholestérol estérifié semble par contre respecté dans le jéjunum et l'iléon alors que les propriétés du duodénum sont constamment apparues très différentes que celles du reste du grêle.

C - Le rôle de la sécrétion pancréatique dans les activités cholestérol estérasiques des contenus digestifs.

Nos résultats nous ont permis de dégager, là encore, une différence profonde entre le contenu duodénal où se manifeste une forte activité hydrolytique et le reste du tube digestif dont l'activité hydrolytique décroissante en direction aborale dépend de façon quasi absolue de la présence de la sécrétion pancréatique.

Des activités cholestérol estérasiques importantes ont été enregistrées "in vivo" et "in vitro" dans l'estomac. Le fait que des activités hydrolytiques subsistent très loin dans le tube digestif (puisque une activité notable peut être détectée dans le côlon) permet d'envisager une explication à propos de la présence de ces activités dans l'estomac. L'hypothèse d'un reflux du suc pancréatique dans l'estomac peut être écartée ; par contre la pratique de la coprophagie chez le lapin offre une possibilité d'explication. Nous avons réalisé des incubations du contenu gastrique de lapins privés de sécrétion pancréatique en rajoutant 50 microlitres de suc pancréatique (environ 0,2 mg de protéines). Nous avons observé une activité hydrolytique modérée (15 p 100 en deux heures). On peut discuter de la signification physiologique d'une telle expérience, mais elle montre que les conditions régnant dans l'estomac n'inhibent pas le cholestérol estérase pancréatique. Il faut noter que si les lapins avaient pratiqué la coprophagie le milieu gastrique pourrait être enrichi en acides gras libres dont l'abondance peut déplacer le sens de la réaction. La privation de sécrétion pancréatique entraîne en effet une stéatorrhée (DAVENDORT) (23) caractérisée chez le lapin par une abondante sécrétion d'acides gras libres (BACQUES & Coll) (63).

La puissante activité estérifiante présentée par le suc pancréatique ne se retrouve à aucun niveau, ce n'est que dans le duodénum que l'on

enregistre une faible estérification. Le pH relativement élevé des deux derniers tiers du grêle n'est certainement pas favorable à l'estérification par contre on aurait pu s'attendre à avoir des estérifications dans la partie supérieure du grêle avant que le suc pancréatique n'ait effectivement élevé le pH. MONTINI & ARRIGO (57) ont montré que les méthylnaphtoquinones (vitamines K) peuvent inhiber l'activité estérasique de l'enzyme pancréatique en respectant l'activité hydrolytique, or le régime herbivore et la microflore caecale maintiennent un taux élevé en vitamines K dans le tractus digestif du lapin. D'autre part les acides biliaires en excès (taurocholate surtout) peuvent, même si les conditions de pH sont favorables à l'estérification, renverser le sens de la réaction et amorcer une hydrolyse des esters (KELLY) (48). Notons toutefois que chez le lapin le principal acide biliaire n'est pas le taurocholate mais le glycodesoxycholate (GREGG & POLEY) (39).

CONCLUSIONS

Pour préciser le rôle de la sécrétion pancréatique exocrine dans les transformations et l'absorption intestinale du cholestérol et de ses esters chez le lapin, nous avons procédé en circonscrivant nos investigations à une analyse de plus en plus restreinte des phénomènes en procédant par étapes :

Dans un premier temps l'influence de la sécrétion pancréatique a été étudiée sur l'apport de cholestérol dans l'organisme "in toto", un régime hypercholestérolé servant de révélateur.

Nous avons suivi ensuite "in vivo" le rôle de cette sécrétion dans le sort intraluminal et intramucosal du cholestérol libre ou des esters de cholestéryle.

En dernier lieu nous avons précisé "in vitro" l'orientation des activités cholestérol estérasiques du suc pancréatique et du contenu digestif à différents niveaux en dégageant l'influence de cette sécrétion.

Pour ce faire nous avons été amenés à mettre en oeuvre des techniques d'analyse chromatographiques des lipides et du cholestérol. Nous avons eu d'autre part recours aux molécules radioactives, soit par simple marquage au tritium, ou bien par double marquage au tritium et au carbone-¹⁴ pour l'étude simultanée du devenir du cholestérol libre et estérifié.

La privation de sécrétion pancréatique n'entraîne pas de modifications profondes ou durables des taux de cholestérol dans l'organisme. Pendant que la synthèse endogène vient compenser l'absorption diminuée de cholestérol une phase transitoire peut être objectivée par un abaissement de la cholestérolémie estérifiée et corrélativement une hausse du taux des triglycérides.

Les effets d'un régime hypercholestérolémiant sur la concentration et la composition des lipides plasmatiques sont considérablement atténués par la suppression de la sécrétion pancréatique. Une certaine tendance à l'hypercholestérolémie subsiste néanmoins chez les lapins opérés, caractérisée par une élévation du pourcentage des esters de cholestéryle plasmatiques et par une inversion du rapport acide oléique/acide linoléique dans ces esters.

La sécrétion pancréatique semble donc capable de moduler l'apport de cholestérol d'origine exogène au pool de l'organisme. Grâce aux possibilités de synthèse endogène existe un plancher en deça duquel l'influence de cette sécrétion devient négligeable. Au-delà de ce seuil la sécrétion pancréatique favorise l'absorption du cholestérol exogène même présent à fortes doses dans la ration.

. La captation jéjunoiléale du cholestérol est la plus importante et dépend étroitement de la présence de sécrétion pancréatique. Le maximum d'absorption se situe au niveau du jéjunum. Il se trouve légèrement décalé en position iléale proximale pour le cholestérol provenant des esters, ce décalage étant probablement dû au retard qu'apporte l'étape de l'hydrolyse.

. Une captation duodénale est possible, ne nécessitant pas l'intervention du suc pancréatique. Cette captation particulière, qui n'a jamais été signalée chez le lapin, semble représenter environ 15 p 100 de la captation totale du grêle.

D'autre part certains de nos résultats tendraient à indiquer qu'une absorption directe d'esters de cholestéryle est possible dans le duodénum du lapin.

. D'importantes activités hydrolytiques vis-à-vis des esters de cholestéryle sont présentes tout au long du tube digestif du lapin. A l'exception de l'activité du contenu duodénal, ces activités dépendent toutes de la présence de sécrétion pancréatique et nous les attribuerons à la cholestérol estérase du suc pancréatique.

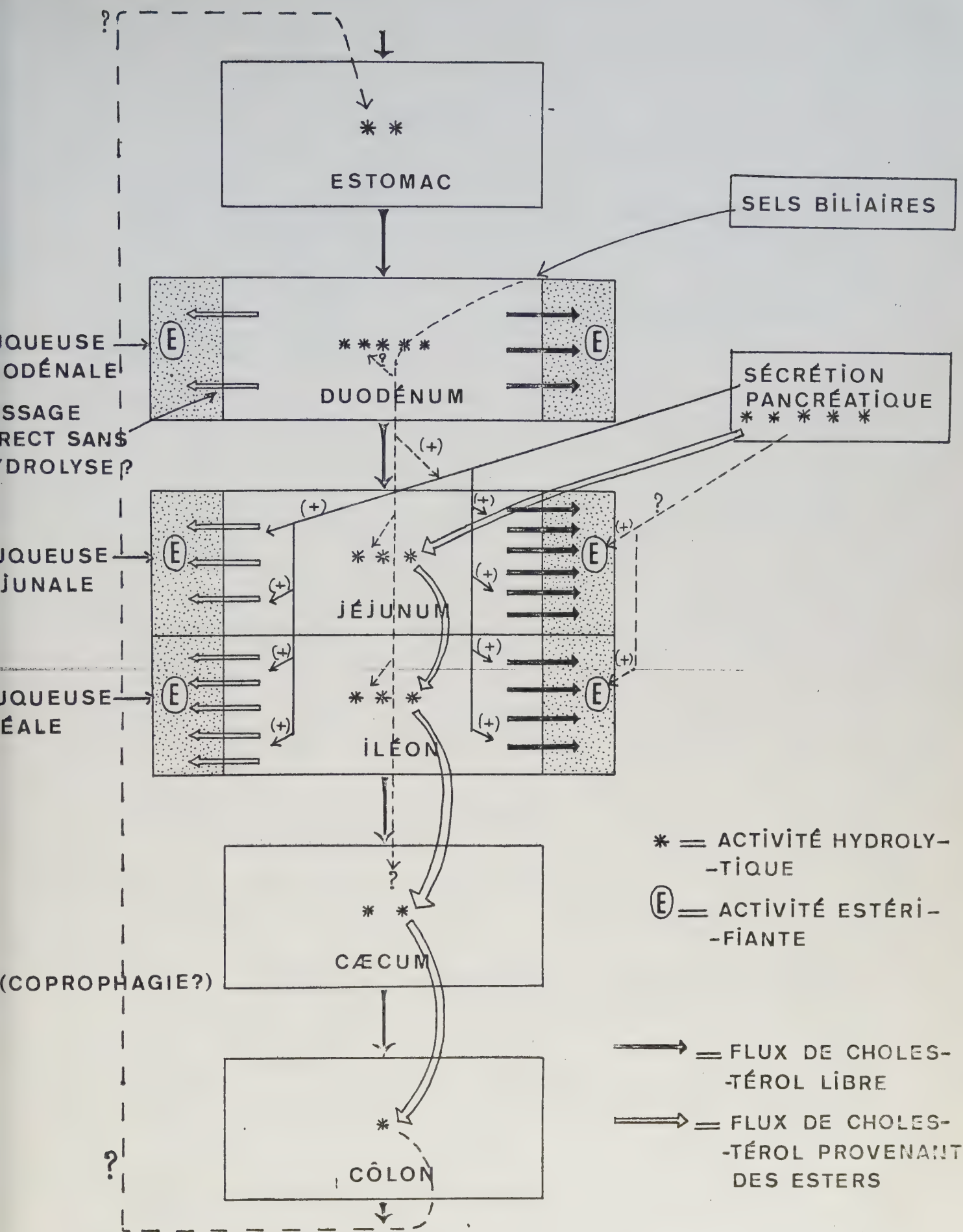
Le duodénum fait encore exception : son contenu présente une activité hydrolytique très intense qui persiste en l'absence de sécrétion pancréatique. Cette activité ne semble pas subsister au-delà du duodénum, aussi pensons-nous que son action est relativement fugace.

. L'activité hydrolytique des contenus gastriques que nous avons mise en évidence n'a jamais été décrite à notre connaissance. Son origine reste incertaine ; du fait qu'une activité d'origine pancréatique peut subsister jusqu'au côlon d'une part, et que l'enzyme pancréatique est active en milieu gastrique d'autre part, on peut envisager une origine pancréatique

résiduelle provenant des crottes que le lapin réingère par coprophagie.

. Le taux de cholestérol estérifié dans la muqueuse n'est pas diminué à la suite de la privation de sécrétion pancréatique. Il semble donc que le suc pancréatique intervient plutôt sur l'étape du passage de la lumière intestinale à la muqueuse en favorisant notamment la dispersion micellaire du cholestérol.

Nous pensons que, liée aux propriétés particulières d'absorption du duodénum et à l'activité hydrolytique puissante de la cholestérol estérase pancréatique, la disposition anatomique du canal de Wirsung peut offrir une explication des remarquables possibilités d'absorption du cholestérol chez cet animal. Cette disposition impose en effet l'absorption simultanée du cholestérol et des autres lipides au niveau jéjunal, permettant au cholestérol de se trouver favorablement émulsionné - et de ce fait efficacement absorbé - sur son site de captation maximum.



FIGO : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU RÔLE DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE DANS LES PROCESSUS D'HYDROLYSE ET D'ESTÉRIFICATION DU CHOLESTÉROL ET DE SES ESTERS AINSI QUE DE LA CAPTATION PAR LA MUQUEUSE DANS L'INTESTIN DU LAPIN.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMENTA J.S.
A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography.
J. Lip. Res. (1964) 5 270.
2. ARRIGO L. et T. MONTINI
Intestinal deficiency : increased elimination of endogenous cholesterol after pancreatectomy.
Athena (Rome) (1951) 17 155.
3. BACQUES C. DEMIGNE C. et C. VAITON
Influence de la ligature du canal pancréatique et de la caecumectomie sur l'excrétion fécale des lipides chez le lapin.
C.R. Soc. Biol. (1970) 164 1500.
4. BADZIO T.B.
The possibilities of errors in determination of cholesterol in blood with FeCl₃.
Clin. Chim. Acta. (1965) 11 53.
5. BADZIO T.B. et H. BOCZON
The determination of free and esterified cholesterol in blood after the separation by thin-layer chromatography.
Clin. Chim. Acta. (1966) 13 797.
6. BANKS S. KRUT L. MARKS I.N. BRONTE-STEWART B. et P.J. RUYS
Hydrolysis of fat by human gastric juice.
Gut. (1964) 4 480.
7. BARTLETT G.R.
Phosphorus assay in column chromatography.
J. Biol. Chem. (1959) 234 466.
8. BEHER W.T. BAKER G.D. et D.G. PENNEY
Time course of fecal steroid - ¹⁴C in various rodents.
Amer. J. Physiol. (1963) 205 1159.
9. BELL C.C. et L.L. WELL
Effect of total pancreatectomy on cholesterol absorption and cholesterol serum level in man.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1968) 128 575.
10. BEUKERS H. VELTKAMP W.A. et J.M. HOOGWINKEL
A method for the determination of the molecular distribution of free and esterified cholesterol in serum by thin-layer chromatography.
Clin. Chim. Acta. (1969) 25 403.
11. BILLS C.E.
Physiology of the steroids, including the vitamins.
D. Physiol. Res. (1935) 15 1.
12. BISERTE C. SEZILLE G. BERTRAND M. et J. JAILLARD
Exploration lipidique au cours du diabète.
Ann. Biol. Clin. (1964) 22 861.

13. BORGSTROM B.
Studies on cholesterol absorption in the human.
J. Clin. Invest. (1960) 39 809.
14. BORGSTROM B. et L. KRABISCH
A note on the preparation of small quantities of labelled fatty acid chlorides.
J. Lip. Res. (1963) 4 357.
15. BORGSTROM B. LINDHE B. et P. WLODAWER
Absorption and distribution of cholesterol-4-¹⁴C in the rat.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1958) 99 365.
16. BORJA C.R. VAHOUNY G.V. et C.R. TREADWELL
Role of bile and pancreatic juice in cholesterol absorption and esterification.
Amer. J. Physiol. (1964) 206 223.
17. BUCHWALD D.D. et R.L. GEBHARD
Effect of intestinal bypass on cholesterol absorption and blood levels in the rabbit.
Amer. J. Physiol. (1964) 207 567.

BUCHWALD D.D. et R.L. GEBHARD
Localization of bile salts absorption in vivo in the rabbit.
Ann. Surgery. (1968) 167 191.
18. BUSH E.T.
General applicability of the channel ratio method of measuring counting efficiency.
Anal. Chem. (1963) 35 1024.
19. BYERS S.O. FRIEDMANN M. et B. GUNNING
Observations concerning the production and excretion of cholesterol in the mammals. IX. The intestinal site of absorption and excretion of cholesterol.
Amer. J. Physiol. (1953) 175 379.
20. CHAIKOFF I.L. et A. KAPLAN
The influence of the ingestion of raw pancreas upon the blood lipids of completely depancreatized dogs maintained with insulin.
J. Biol. Chem. (1955) 112 155.
21. COOK R.P. KLIMAN A. et L. FIESER
The absorption and metabolism of cholesterol and its main companions in the rabbit-with observations on the atherogenic nature of the sterols.
Arch. Biochim. Biophys. (1954) 52 439.
22. DALLOCHIO M. CROCKETT R. RAZAKA G. SALLENAVE M. NICOULEAU P. BRICAUD H. et P. BROUSTET
Athérosclérose expérimentale par régime hypercholestérolé : évolution à long terme (étude chez le lapin).
Arch. Mal. Coeur. (1969) Suppl n° 2 54.
23. DAVENPORT H.W.
"Physiologie de l'appareil digestif".
Masson & Cie. Paris (1968) pp147 et 219.

24. DAVIDSON M.B. et R. KARJALA
Simplified method for the determination of plasma glycerol.
J. Lip. Res. (1970) 11 609.

25. DAY A.J. WAHLQVIST M.L. et D.J. CAMPBELL
Differential uptake of cholesterol and different cholesterol esters by atherosclerosis intima in vivo and in vitro.
Atherosclerosis (1970) 11 301.

26. DELSAL J.L.
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal.
Application aux microdosages du cholestérol, des phosphoaminolipides et des protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1944) 26 99.

27. DOLE V.P.
Dosage des acides gras non estérifiés dans le plasma.
J. Clin. Invest. (1956) 35 150.

28. FAVARGER P.
Le rôle du cholestérol dans la résorption des graisses.
Arch. Int. Pharmacodyn. (1942) LXVIII 409.

FAVARGER P.
Influence favorable de certains stérols sur la cholestérolémie et leur rôle dans la résorption du cholestérol.
Dans "Journées Thérapeutiques de Paris" (1955) G. Doin & Cie E. (1956).

29. FAVARGER P. et E.F. METZGER
La répartition intestinale du deutérocholestérol et sa répartition dans l'animal sous forme libre et estérifiée.
Helv. Chim. Acta. (1952) 35 1811.

30. FELDMAN E. et D.H. HENDERSON
Cholestérol absorption by jejunum and ileum.
Biochim. Biophys. Acta. (1969) 193 221.

31. FILLERUP D.L. et MEAD J.
Chromatographic separation of the plasma lipids.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1953) 83 574.

32. FONTAINE T. LE BRETON E. et J. PANTALEON
Action comparée du tissu et du suc pancréatique sur les esters de cholestérol du sérum. Mise en évidence d'une cholestérol estérase dans le suc pancréatique.
C.R. Soc. Biol. (1943) 137 611.

33. FRIEDMAN M.S. BYERS O. et E. SHIBATA
Observations concerning the production and excretion of cholesterol in the mammals. X. Factors affecting the absorption and fate of ingested cholesterol.
J. Exptl. Med. (1956) 98 107.

34. FUNT B.L. et A. HETHERINGTON
The kinetics of quenching of liquid scintillators.
Int. J. Appl. Rad & Isotopes (1962) 215 13.

35. GALLO-TORRES H.G. MILLER O.N. et S.G. HAMILTON
Further studies on the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut.
Arch. Biochim. Biophys. (1971) 14 22.
36. GLOVER J. et R. MORTON
The absorption and the metabolism of sterols.
Brit. Med. Bull. (1958) 14 226.
37. GOLDMAN J. et R. GOODALL
Quantitative analyses on thin-layer chromatograms : a theory for light absorption methods with an experimental verification.
J. Chromatog. (1968) 32 24.
38. GOODMAN et SHIRATORI
cités par VAHOUNY et TREADWELL dans "Cholesterol Absorption" p 1413
in "Handbook of Physiology" (1969) Saunders Ed.
39. GREGG J.A. et J.R. POLLEY
Excretion of bile acids in normal rabbits.
Amer. J. Physiol. (1966) 211 1147.
40. HERNANDEZ H.H. CHAIKOFF I.L. DAUBEN W.G. et S.A. ABRAHAM
The absorption of ^{14}C -labeled epicholesterol in the rat.
J. Biol. Chem. (1954) 206 757.
41. HERNANDEZ H.H. et I.L. CHAIKOFF
Purification and properties of pancreatic cholesterol esterase.
J. Biol. Chem. (1957) 228 445.
42. HERNANDEZ H.H. CHAIKOFF I.L. et J.Y. KIYASU
Role of pancreatic juice in cholesterol absorption.
Amer. J. Physiol. (1955) 181 523.
43. HERTING G.D. et S.R. AMES
On the gastric lipolysis of fat.
Arch. Biochem. Biophys. (1955) 55 295.
44. HIGASHIMURA T. YAMADO O. NOHARA N. et T. SHIDEI
External standard method for the determination of the efficiency in liquid scintillation counting.
Int. J. Appl. Rad & Isotopes (1962) 13 308.
45. HOUX N.W.
Liquid scintillation radioassay by thin-layer chromatograms.
Anal. Biochem. (1969) 30 302.
46. JAMES A.T. et A.J. MARTIN
Gas liquid chromatography : the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic to n-octadecanoic acid.
Biochemistry. (1956) 63 144.
47. JOHNSTON J.M.
Mechanism of fat absorption, dans "Handbook of Physiology".
Sect 6. Vol II.C.F.Code (1968) E. W. Heidel.

48. KELLY A.J. et A.I. NEWMANN
Pancreatic sterol ester hydrolase reversal of the reaction by bile salt.
Biochim. Biophys. Acta. (1971) 231 558.
49. KORZENOVSKY M. WALTERS C. HARVEY O. et E. DILLER
Some factors which influence catalytic influence of pancreatic cholesterol esterase.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1960) 105 303.
50. KUKSIS A.
Quantitative lipid analysis by combined thin-layer and gas-liquid chromatographic systems.
Chromatog. Rev. (1966) 8 173.
51. LIEBERMANN C. et H. BURCHARD
"Ueber das Oxychinoterpen".
Ber. Dtsch. Chem. Ges. (1885) 18 1803.
52. LIN T.M. KARVINEN E. et A.C. IVY
Role of pancreatic digestion in cholesterol absorption.
Amer. J. Physiol. (1957) 190 214.
53. LOSSOW W.J. MIGLIORINI R.H. BROTH N. et I.L. CHAIKOFF
Effect of total exclusion of the exocrine pancreas in the rat upon in vitro esterification of ^{14}C -labelled cholesterol by the intestine and upon absorption of ^{14}C -labelled cholesterol.
J. Lip. Res. (1964) 5 198.
54. LOWRY O.H. ROSENBROUGHT N.J. FARR A.L. et R.J. RANDALL
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. (1951) 193 263.
55. LUTTON C.E. et T. TSALTAS
Plasma lipid variations and fatty acid composition in normal male and female adult rabbits.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1965) 118 1048.
56. MAHADEVAN V. et W.O. LUNDBERG
Preparation of cholesterol esters of long chain fatty acids and characterization of cholesteryl arachidonate.
J. Lip. Res. (1962) 3 106.
57. MONTINI T. et L. ARRIGO
Sulla presenza di un fattore lipotropo nel succo pancreatico en negli esterati di pancreas.
Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. (1952) 28 209.
58. MORRISON W.R. et L.L. SMITH
Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluorid-methanol.
J. Lip. Res. (1964) 5 600.
59. MURDOCK H.R.
Anesthesia in the rabbit.
Fed. Proc. (1969) 28 1510.

60. MURTHY S.K. et J. GANGULY
Studies on cholesterol esterases of small intestine and pancreas of rat.
Biochem. J. (1962) 83 460.
61. MURTHY S.K. DAVID J.S. et J. GANGULY
Some observations on the mechanism of absorption of cholesterol in rats.
Biochim. Biophys. Acta. (1963) 70 490.
62. NICOD J.L.
Athérome artériel, pp 13-32 :
dans "Journées Thérapeutiques de Paris" (1955) G. Doin. Ed. (1956).
63. OKITA G.T. KABARA J.T. RICHARDSON F. et V.G. Le ROY
Assaying compounds containing ³H and ¹⁴C.
Nucleonics (1957) 15 111.
64. PESEZ M.
Comportement de quelques nor-19-stéroïdes et des étiocalciférols à l'égard des réactions d'halochromie et d'halofluorie.
Bull. Soc. Chim. Fr. (1958) 25 369.
65. POPJAK G.
The effect of feeding cholesterol without fat on the plasma lipids of the rabbit : the role of cholesterol in fat metabolism.
Biochem. J. (1949) 40 608.
66. RIBET A. et J.P. PASCAL
"Le Pancréas Exocrine"
Masson & Cie Ed. (1968).
67. ROSENFELD R.J. et L. HELLMAN
Reduction and esterification of cholesterol and sitosterol by homogenates of feces.
J. Lip. Res. (1971) 12 192.
68. SHAH S.M. LOSSOW W.T. et I.L. CHAIKOFF
In vitro esterification of cholesterol by pancreatic juice and acetone powder extracts of small intestine : the effect of unsaturated fatty acids upon esterification with saturated fatty acids.
J. Lip. Res. (1965) 6 228.
69. SHEPPARD A.J. MEEKS S.A. et L.W. ELLIOT
Calibration studies of gas chromatographic systems for quantitative analysis of fatty acid methyl esters. I : molar response.
J. Gas. Chromatog. (1968) 6 28.
70. SHOPE R.E.
Cholesterol esterase in animal tissues.
J. Biol. Chem. (1928) 80 127.
71. SHULTZ S.G. et C.K. STRECKER
Cholesterol and bile salt influxes across brush border of rabbit jejunum.
Amer. J. Physiol. (1971) 220 59.

72. SMITH A.L., HAUKE R. et C.R. TREADWELL
Uptake of cholesterol and cholesterol esters by inverted sacs of rat intestine.
Amer. J. Physiol. (1958) 193 34.
73. SWELL L., BYRON J.E. et C.R. TREADWELL
Cholesterol esterases. IV. Cholesterol esterase of rat intestinal mucosa.
J. Biol. Chem. (1950) 186 543.
74. SWELL L. et C.R. TREADWELL
Cholesterol esterases. II. Relative specificity and activity of pancreatic cholesterol esterase.
J. Biol. Chem. (1955) 212 141.

SWELL L. et C.R. TREADWELL
Enzymic preparation of labeled unsaturated fatty acid esters of cholesterol.
Anal. Biochem. (1962) 4 335.
75. SWELL L., TROUT E.C., HOPPER J.R., FIELD H. et C.R. TREADWELL
Mechanism of cholesterol absorption. II. Changes in free and esterified cholesterol pools of mucosa after feeding cholesterol-4-¹⁴C.
J. Biol. Chem. (1958) 233 49.
76. TREADWELL C.R. et G.V. VAHOUNY
"Cholesterol Absorption" p 1417 in "Handbook of Physiology", Alimentary Canal. Saunders. Ed. (1968).

TREADWELL C.R. et G.V. VAHOUNY
Absorption of cholesterol esters in the lymph-fistula rat.
Amer. J. Physiol. (1958) 195 516.

TREADWELL C.R. et G.V. VAHOUNY
Absolute requirement for free sterol for absorption by rat intestinal mucosa.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1964) 116 496.
77. VAHOUNY G.V., WOO C.H. et C.R. TREADWELL
Quantitative effects of bile salts and fatty acid on cholesterol absorption in the rat.
Amer. J. Physiol. (1958) 193 41.
78. VAHOUNY G.V., WEERSING S. et C.R. TREADWELL
Taurocholate protection of cholesterol esterase against proteolytic inactivation.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1964) 15 224.

VAHOUNY G.V., WEERSING S. et C.R. TREADWELL
Micelles solubilized substrates and cholesterol esterase activity in vitro.
Arch. Biochem. Biophys. (1964) 107 7.
79. VANLERENBERGHE J. et R. CASSAIGNE
Dosage du cholestérol dans la bile du rat par chromatographie en phase gazeuse.
Rev. Fr. Et. Clin. & Biol. (1963) XIII 541.

80. WANG I.C. et Coll.
Plasma lipid partition of normal and cholesterol fed rabbit.
J. Mt. Sinai Hosp. (1954) 21 19.
81. WELLS I.C. et E.L. RONGONE
Dietary cholesterol and serum cholesterol esterifying activity in rabbits.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1969) 130 661.
82. WINDAUS A.
"Ueber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin".
Ber. (1909) 42 238.
83. WOLFF J.P.
"Manuel d'Analyse des Corps Gras" pp 49-72.
Azoulan. Ed. (1968) Paris.
84. WOLFF R. et J.J. BRIGNON
Recherches expérimentales sur la résorption intestinale du cholestérol chez le lapin.
dans "Journées Thérapeutiques de Paris" (1955) G. Doin & Cie Ed. (1956).
85. WOOD et Coll cités par De WITT S. GOODMAN
Cholestérol esters metabolism. Physiol. Rev. (1965), 45 : 747.
86. ZILVERSMIT D.B. SWEeley C.C. et H.A. NEWMAN
Fatty acid composition of serum and aortic intimal lipids in rabbits fed low and high cholesterol diet.
Circulation. Res. (1961) 9 235.
87. ZILVERSMIT D.B. COURTICE F.C. et R. FRASER
Cholesterol transport in thoracic duct lymph of the rabbit.
J. Atherosclerosis. (1967) 7 319.
88. SLATKIS A. ZAK B. et A.J. BOYLE
A new method for direct determination of serum cholesterol.
J. Lab. and Clin. Med. (1953) 41 486.

